



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Cirugía

TESIS DOCTORAL

TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE  
MESENQUIMALES EN UN MODELO DE RECHAZO  
CRÓNICO DEL INJERTO PULMONAR

Jose Luis Campo-Cañaveral de la Cruz

Directores:

Dr. David Gómez de Antonio

Dra. Mercedes Zurita Castillo

Tutor:

Prof. Andrés Varela de Ugarte

Madrid 2015







## CONFLICTOS DE INTERÉS:

Este trabajo se ha realizado gracias a una beca otorgada por la Fundación Mutua Madrileña en el año 2011, cuyo código de identificación es PR87532011.



A mis padres, Jose Luis y Benita.

A Rocío y a Sara.



# AGRADECIMIENTOS

Este proyecto es fruto de la confianza depositada en mí por maestros, profesores, familiares, amigos y compañeros. Todos y cada uno de ellos han dejado una huella imborrable.

Gracias a personas concretas que con sus consejos contribuyen a que el resultado sea el mejor de los posibles. A Andrés Varela, por su apoyo y confianza en este y en todos los proyectos en los que nos embarcamos. Por aportar siempre, también en lo personal.

Sin saber por donde empezar quisiera dar las gracias a David Gómez. Por su amistad, por ser referencia desde el principio, por su perseverancia, ayuda y consejos en innumerables cirugías y otros escenarios. Por estar ahí incondicionalmente.

A Mercedes Zurita, por su envidiable capacidad de trabajo y por su orientación en este apasionante mundo de las células madre. Su participación y la de sus compañeros de laboratorio han sido clave para llegar a buen puerto. Muchas gracias.

A Martín Santos, Carmen González e Isabel Millán, por lograr dar sentido al proyecto y por su entrega desinteresada. Hubiese sido imposible sin el trabajo aportado por cada uno de ellos.

A todo el staff del Servicio de Cirugía Torácica que han participado y participan en mi formación día a día. A todos los residentes del servicio de Cirugía Torácica y Cardiovascular, por su entrega en infinitas guardias y trasplantes. A los residentes y amigos del hospital, por largas noches donde todo es posible.

A mis amigos de siempre y para siempre. A los más recientes, porque también son ya de siempre. A la gente de mi pueblo, Mora.

Sobre todo, gracias a mi familia, por soportarlo todo y por ser acicate para seguir adelante. Por su paciencia.

A Silvana, por saber amortiguar todas las caídas y ser capaz de llenarlo todo de luz. Por su sonrisa permanente. Gracias.



## ÍNDICE





# ÍNDICE GENERAL

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1</b>	<b>Células madre .....</b>	<b>3</b>
1.1.1	Células madre embrionarias.....	3
1.1.2.	Células madre de adulto o somáticas .....	6
1.1.3	Células madre pluripotenciales inducidas (iPS) .....	8
<b>1.2</b>	<b>Terapia con células madre.....</b>	<b>9</b>
<b>1.3</b>	<b>Síndrome de Bronquiolitis Obliterante (BOS).....</b>	<b>16</b>
1.	Definición de BOS .....	18
2.	Fisiopatología .....	22
2.1	Mecanismos inmunológicos .....	23
2.2.	Mecanismos independientes de la aloinmunidad.....	25
3.	Diagnóstico de BOS .....	27
4.	Prevención y tratamiento.....	29
5.	Modelos animales de BOS.....	32
<b>2</b>	<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO .....</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>

<b>4 MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1. Consideraciones iniciales.....</b>	<b>45</b>
4.1.1. Desarrollo del modelo animal de BOS: diseño y resultados .....	45
4.1.2. Trasplante de células madre mesenquimales sobre el modelo animal de BOS.....	52
<b>4.2 Extracción de células madre mesenquimales (CMM) de la médula ósea de rata. ....</b>	<b>55</b>
<b>4.3 Caracterización de las CMM por citometría de flujo (CMF). ....</b>	<b>61</b>
<b>4.4 Preparación de las CMM para el trasplante .....</b>	<b>64</b>
<b>4.5 Cirugía: implante del segmento traqueal .....</b>	<b>66</b>
<b>4.6 Trasplante de células madre mesenquimales .....</b>	<b>66</b>
<b>4.7 Eutanasia y obtención de la muestra .....</b>	<b>69</b>
<b>4.8 Detección de las CMM.....</b>	<b>72</b>
<b>4.9 Estudio inmunohistoquímico (IHQ).....</b>	<b>74</b>
<b>4.10 Variables .....</b>	<b>75</b>
<b>4.11 Estadística .....</b>	<b>76</b>
 <b>5 RESULTADOS.....</b>	 <b>81</b>
<b>5.1 Estudio macroscópico .....</b>	<b>82</b>
<b>5.2 Estudio microscópico .....</b>	<b>88</b>
a) Injerto traqueal .....	88
b) Parénquima alrededor del injerto traqueal .....	102
<b>5.3 Análisis histopatológico .....</b>	<b>103</b>
<b>5.4 Localización y diferenciación de las CMM .....</b>	<b>109</b>

<b>6</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>117</b>
6.1	Modelo animal de BOS: trasplante traqueal heterotópico .....	117
6.2	Papel de las CMM en el modelo animal de BOS.....	120
6.3	Papel de las CMM en los procesos de reparación y regeneración pulmonar .....	125
6.4	Momento del trasplante de CMM.....	128
6.5	Vías de administración y dosis de CMM.....	128
6.6	Limitaciones .....	131
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>135</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>139</b>
<b>9</b>	<b>PUBLICACIONES DERIVADAS.....</b>	<b>160</b>



## **ABREVIATURAS**



## LISTADO DE ABREVIATURAS

- Ac: anticuerpo
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- APC: *antigen presenter cell*, células presentadoras de antígenos, en sus siglas en inglés
- ATS: *American Thoracic Society*, Sociedad Americana del Tórax, en sus siglas en inglés
- BAL: *brochoalveolar lavage*, lavado broncoalveolar, en sus siglas en inglés
- BO: bronquiolitis obliterante
- BOS: *bronchiolitis obliterans syndrome*, síndrome de bronquiolitis obliterante, en sus siglas en inglés
- CLAD: *chronic lung allograft dysfunction*, disfunción crónica del injerto pulmonar, en sus siglas en inglés
- CME: células madre embrionarias
- CMF: citometría de flujo
- CMM: células madre mesenquimales
- CMV: citomegalovirus
- CSC: *cardiac stem cells*, células madre residentes cardíacas, en sus siglas en inglés
- DPI: disfunción primaria del injerto
- EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica
- ERS: *European Respiratory Society*, Sociedad Respiratoria Europea, en sus siglas en inglés
- FEF<sub>25-75</sub>: flujo espiratorio forzado entre el 25% y el 75% de la capacidad vital forzada
- FEV1 / VEMS: volumen espiratorio máximo en el primer segundo
- FITC: isotiacinato fluoresceína, en sus siglas en inglés
- FIV: fecundación in vitro
- FPI: fibrosis pulmonar idiopática
- FQ: fibrosis quística



- HLA: *human leucocyte antigen*, antígeno leucocitario humano, en sus siglas en inglés
- IHQ: inmunohistoquímica
- iPS: *induced pluripotent stem*, células madre pluripotenciales inducidas, en sus siglas en inglés
- ISCT: *International Society of Cell Therapy*, Sociedad Internacional de Terapia Celular, en sus siglas en inglés
- ISHLT: *International Society of Heart and Lung Transplantation*, Sociedad Internacional de Trasplante de Corazón y Pulmón, en sus siglas en inglés
- NRAD: *neutrophilic reversible allograft dysfunction*, disfunción del injerto neutrofílica reversible, en sus siglas en inglés
- PDGF: *platelet derived growth factor*, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, en sus siglas en inglés
- PE: *phicoeritrina*, ficoeritrina, en sus siglas en inglés
- PRP: plasma rico en plaquetas
- RA: rechazo agudo
- RAS: *restrictive allograft syndrome*, síndrome restrictivo del injerto, en sus siglas en inglés
- RB: ranking buffer, en sus siglas en inglés
- RGE: reflujo gastroesofágico
- SDRA: síndrome de distrés respiratorio del adulto

## *INTRODUCCIÓN*



## **1 INTRODUCCIÓN**

### **1.1 CÉLULAS MADRE**

En general, se define una célula madre como toda célula con capacidad de autorrenovarse y de experimentar divisiones asimétricas (1-5). De cada división asimétrica surge una célula madre igual que la original y otra célula que puede diferenciarse hacia varias estirpes (multilinaje) y que es capaz de originar células madre unipotenciales, que en algunas circunstancias pueden revertir su dirección y adquirir fenotipo de célula madre (6). Tanto el número de células madre como el proceso de diferenciación están muy regulados en el organismo, manteniéndose siempre una cantidad adecuada de células precursoras indiferenciadas y de su progenie diferenciada. Además, las células precursoras que resulten de los procesos de división pueden permanecer quiescentes hasta estadios tardíos del desarrollo o estar disponibles para situaciones de estrés (1).

Existen diferentes tipos de células madre entre las que están las células madre embrionarias, las células madre adultas o de tejidos concretos y las células madre de pluripotencialidad inducida (iPS por su siglas en inglés).

#### **1.1.1 Células madre embrionarias**

A pesar de que los primeros trabajos con células madre embrionarias (CME) de ratón datan de la década de los 80, no fue hasta 1998 cuando se aislaron las primeras CME de procedencia humana (7), abriéndose así un nuevo campo de investigación y de ulterior aplicabilidad clínica.

Se denomina célula madre embrionaria a aquella que deriva del embrión de un mamífero en su estadio de blastocisto y que tiene la capacidad de dar lugar a cualquier célula diferenciada del organismo.

Tras la penetración del espermatozoide, el óvulo fecundado adquiere la condición de cigoto, en el que se van produciendo sucesivamente distintos períodos de

división celular que aumentan rápidamente el número de sus células, las cuales reciben el nombre de blastómeros. Días después el embrión tiene el aspecto de una esfera compacta que se denomina mórula y que contiene de 12 a 16 blastómeros. Hasta este momento, dichos blastómeros tienen capacidad totipotencial, es decir, son capaces de generar un individuo completo incluyendo las células germinales y la placenta.

Durante el siguiente estadio, llamado de blastocisto, el embrión se compone de una masa celular externa o trofoblasto (del que derivará la placenta) y de una masa celular interna o embrioblasto. Las células derivadas de esta última son células madre embrionarias con capacidad pluripotencial, esto es, que pueden originar células de todas las capas embrionarias (ectodermo, endodermo y mesodermo) pero necesitan del trofoblasto para conformar el individuo completo.

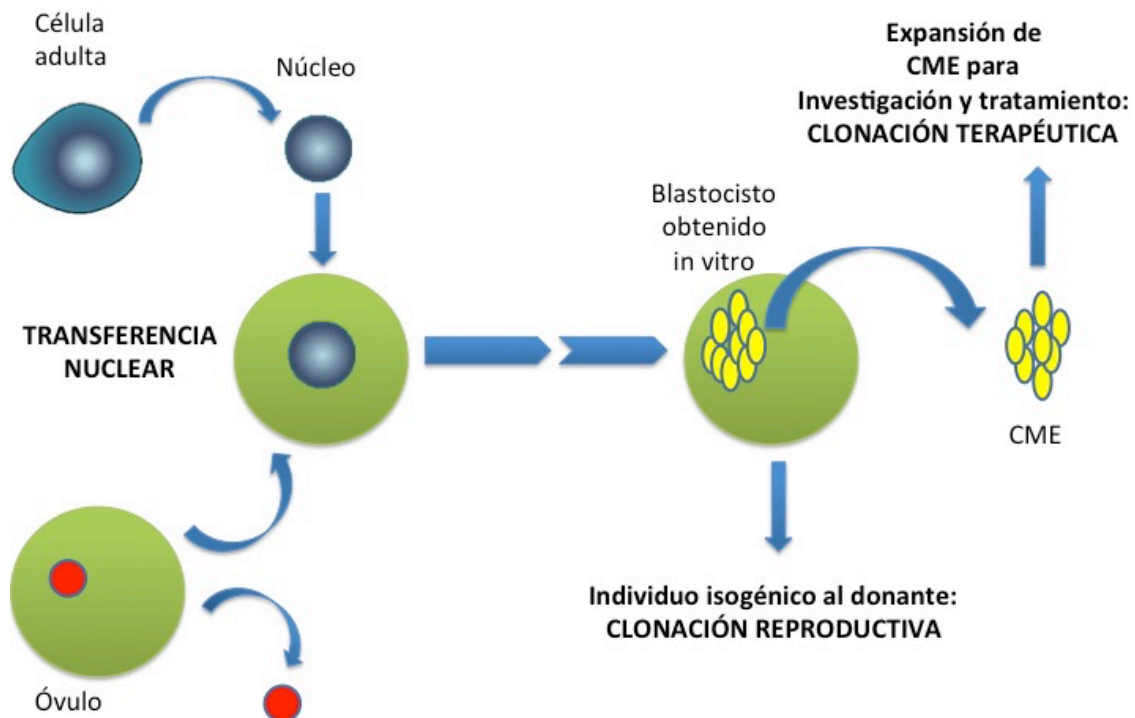
Es importante destacar que las células madre embrioblásticas de la masa celular interna no mantienen *in vivo* su capacidad de pluripotencial de forma indefinida puesto que se van diferenciando en diferentes linajes celulares. Sin embargo, si se extraen del embrión, *in vitro* son capaces de proliferar de forma ilimitada y mantener su potencialidad (7-11).

Precisamente las técnicas de Fecundación *in vitro* (FIV) ofrecen una oportunidad de obtener este tipo de células. En cada procedimiento de FIV se obtienen embriones sobrantes que en la actualidad se congelan y que son válidos en muchos ámbitos legales para investigación. La expansión de este tipo de células presenta varias limitaciones, entre ellas controlar el microambiente de cultivo. El principal inconveniente es su procedencia alogénica, lo cual implica diferencias en el sistema HLA que puede dar lugar a problemas de rechazo tras la aplicación clínica.

Sin embargo, estas reacciones inmunes a células alogénicas podrían paliarse empleando células embrionarias del propio sujeto (lo que equivaldría a un autotrasplante). Este procedimiento se denomina clonación terapéutica por transferencia nuclear (7, 12) (Figura 1) y se basa en aislar el núcleo de una célula somática adulta e introducirlo en un óvulo desnucleado. Este nuevo embrión se llevaría a la fase de blastocisto para obtener células embrionarias de la masa celular interna, las cuales pueden someterse a procesos de diferenciación hacia líneas comprometidas que den lugar a tejidos adultos, obviando así la mayoría de problemas

inmunogénicos. Si una vez formado el nuevo embrión se dejase crecer en un útero daría lugar a un individuo genotípicamente casi idéntico. Este proceso, también derivado de la transferencia nuclear, se conoce como clonación reproductiva (13, 14). El primer ejemplo de clonación de este tipo fue la famosa oveja Dolly (13).

Figura 1. Transferencia nuclear. CME: células madre embrionarias



En cuanto a la clonación reproductiva es importante mencionar que resulta un procedimiento muy ineficaz. Durante el desarrollo de los embriones es necesaria la activación de genes que actúan en etapas tempranas (y que en estas células donadoras de núcleos se encuentran suprimidos) y la supresión de los genes asociados a la diferenciación que ya están activos en la célula donante del núcleo. Se trata de una compleja “reprogramación” del núcleo de la célula que da lugar a múltiples errores de transcripción y traducción, derivando en aberraciones genéticas y alteraciones fenotípicas de consecuencias insalvables para la mayoría de los

embriones. Además, la eficacia del proceso también tiene que ver con otros factores como el tipo de célula donante y el estado de maduración de la misma (15).

La clonación terapéutica requiere de una serie de técnicas y manipulaciones para expandir y diferenciar las CME hacia determinadas poblaciones celulares, como por ejemplo hacia progenitores neurales (16-18), precursores hematopoyéticos (19), células productoras de insulina (20, 21), cardiomiocitos (22) o neuronas dopaminérgicas (23). El hecho de que los diferentes protocolos de diferenciación celular hayan sido efectivos abre la puerta para incorporar la clonación terapéutica como una opción de tratamiento en diversas enfermedades (neurodegenerativas, procesos hematológicos, diabetes...), en las que el eventual trasplante de estas células no tendría tantas limitaciones de inmunocompatibilidad existentes con células de origen alogénico. Además, protocolos experimentales en animales han demostrado que la transferencia nuclear sumada a técnicas de manipulación y recombinación génica supone una alternativa válida para el tratamiento de determinadas alteraciones genéticas (24).

Aunque las posibilidades de aplicación clínica hacen de esta técnica la más atractiva, existen dificultades. Algunas de ellas son la tumorigenicidad de estas células (formación de teratomas tras la implantación in vivo), la diferenciación espontánea, la reprogramación epigenética del núcleo celular y el genoma mitocondrial (que participa en la producción de determinadas proteínas y que puede generar inmunogenicidad en el receptor, por lo que se piensa que puede jugar un papel en el rechazo de los tejidos) (25).

Por otro lado, desde el punto de vista ético, el procedimiento es cuestionado por algunos sectores de la comunidad científica, ya que para la obtención de las CME se crean embriones que se llevan a la fase de blastocisto, y se destruyen tras la extracción de las mismas.

#### 1.1.2. Células madre de adulto o somáticas

Las células madre somáticas se han definido clásicamente como una célula madre que forma parte de la estructura y función de un tejido adulto, que tiene una capacidad limitada para diferenciarse y que, por lo tanto, puede sustituir o “recambiar”

únicamente a las células del tejido al que pertenece (26, 27). Estas células se han identificado en diferentes órganos y tejidos como son la médula ósea, sangre periférica, sangre del cordón umbilical, cerebro, médula espinal, grasa, pulpa dentaria, vasos sanguíneos, músculo esquelético, piel, tejido conjuntivo, córnea, retina, hígado, conductos pancreáticos, folículo piloso, tejido gastrointestinal y pulmón (28-32).

No obstante, diversos experimentos han demostrado que las células madre de origen somático además pueden diferenciarse hacia células de distintas hojas embrionarias y, por lo tanto, con diferentes funciones. A este proceso se le conoce como transdiferenciación celular (33). Es más, se ha conseguido diferenciar células madre hematopoyéticas hacia células de las tres hojas embrionarias (34) tales como células endoteliales, cardiomiocitos, miocitos, hepatocitos, neuronas, piel e intestino (35-41). Otros grupos han dado este paso a partir de adipocitos (42).

Por otra parte, se han descrito otros procesos para explicar la plasticidad observada en las células madre adultas, la desdiferenciación y la fusión celular (43, 44). En los últimos años, la fusión celular se ha identificado como un mecanismo de gran peso tanto en el desarrollo normal del individuo como en la renovación tras una lesión tisular y en la plasticidad de las células madre. Concretamente se ha demostrado su implicación en procesos de regeneración tisular en el hígado, pulmón, músculo, cerebro, corazón e intestino (45-52).

Otro concepto incorporado últimamente es el de “nicho de células madre”, el cual se define como una compleja estructura que forma parte del microambiente celular y que integra señales tanto locales como sistémicas que regulan de forma positiva y/o negativa la actividad de la célula madre (53). Un mejor conocimiento de los nichos de células madres y su correcta manipulación pueden jugar un papel importante en los procesos de diferenciación de las células madre somáticas hacia líneas celulares concretas.

#### Células madre mesenquimales (CMM) derivadas de médula ósea.

Este tipo de CMM son una población celular propia de la médula ósea, tejido complejo y sinusoidal que se encuentra en la cavidad medular de los huesos largos,



esternón, huesos pélvicos y de la parte esponjosa de las vértebras. La médula ósea posee además otra población de células madre bien diferenciadas, las células madre hematopoyéticas.

Las CMM residen en el estroma medular y representan tan sólo del 0.001 al 0.01% del total de la población celular de la médula (54). Fueron caracterizadas por primera vez por Friedenstein, quien las aisló de la médula ósea y las describió como células adherentes de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos (55, 56).

Ya en el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, en sus siglas en inglés) propuso tres criterios para definir las células madre mesenquimales (57):

- Deben ser adherentes en cultivo.
- Deben expresar los antígenos CD73 (relacionado con mecanismos de adhesión celular), CD90 (marcador de precursor mesenquimal temprano) y CD105 (que interviene en la regulación de distintos componentes de la matriz extracelular como fibronectina y colágeno, razón por la cual se cree que está relacionado con procesos de angiogénesis y reparación vascular), en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45 (que son marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B).
- Deben ser capaces de diferenciarse in vitro a células de origen mesodérmico en osteoblastos, adipocitos y condrocitos, bajo condiciones estándar de cultivo.

### 1.1.3 Células madre pluripotenciales inducidas (iPS)

Son células maduras con una función especializada (por ejemplo, células epiteliales) que son reprogramadas hasta conseguir una desdiferenciación que las convierta en pluripotenciales, como son las células madre embrionarias.

Yamanaka y colaboradores demuestran en 2006 y 2007 la viabilidad de este proceso tanto a partir de células murinas adultas como de fibroblastos humanos (58, 59), haciéndole merecedor del Premio Nobel en 2012.

Teóricamente, con esta técnica, el problema ético/legal de la fuente de células madre pluripotenciales quedaría resuelto. No obstante, existen multitud de

inconvenientes inherentes al proceso de “fabricación” de estas células que sitúan su uso en la clínica en un plano más alejado que las células madre embrionarias o somáticas.

## 1.2 TERAPIA CON CÉLULAS MADRE

La célula madre ideal para su aplicación terapéutica sería aquella que tuviese un carácter pluripotencial efectivo, capacidad de autorrenovación indefinida, que poseyera una caracterización fenotípica estable, sin potencial tumorigénico y con posibilidades de manipulación de su genoma.

Los desarrollos en el campo de la ingeniería celular hacen más tangible la esperanza del uso clínico de las células madre para terapias celulares y trasplantes de tejidos, evitando los problemas de histocompatibilidad asociados a los aloinjertos.

Probablemente el área más prometedor de las células madre es la medicina regenerativa y reparadora. Los tejidos que hayan sufrido algún daño, o simplemente el envejecimiento, teóricamente pueden ser reparados por poblaciones de células madre debidamente “orientadas” y proporcionando el microambiente adecuado.

### 1.2.1 Tejido miocárdico.

La insuficiencia cardíaca, una de las enfermedades más prevalentes en la sociedad actual, es resultado del daño en el músculo cardíaco derivado de coronariopatías, hipertensión arterial periférica o por hipertrofia del propio músculo. Múltiples estudios y ensayos clínicos están en marcha para encontrar un método bien para la prevención de la insuficiencia cardíaca o bien para la reparación del tejido cuando ésta ya se ha establecido. Diferentes tipos de células madre (hematopoyéticas,

mesenquimales derivadas de médula ósea o células madre residentes en el tejido miocárdico) están siendo estudiadas como línea de tratamiento para la regeneración y reparación cardíaca tras un infarto de miocardio.

A día de hoy, el abordaje más usado para la aplicación de células madre en los diferentes ensayos es la inyección intracoronaria (60). Sin embargo, tras prometedores estudios preclínicos y clínicos, se diseñaron ensayos randomizados con resultados poco concluyentes (61-67).

A pesar de que uno de los mayores ensayos multicéntricos sobre el tratamiento del infarto de miocardio con mioblastos autólogos no ha demostrado ninguna mejora significativa en la función cardíaca (68, 69) existen otros estudios que sí han conseguido mejoría en parámetros como la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (70, 71) e, incluso, evitan una incorrecta remodelación del tejido infartado (72). Otro estudio ha demostrado una reducción significativa tanto de eventos isquémicos posteriores al infarto como de arritmias postinfarto mediante la inyección intracoronaria de células madre hematopoyéticas (62).

Por tanto, tras una década de ensayos clínicos bien diseñados, el uso de células madre hematopoyéticas en la regeneración miocárdica sigue siendo controvertido ya que, aunque ha demostrado ser un tratamiento seguro, no se ha evidenciado una reducción en la mortalidad, la tasa de reinfartos o de reingresos (60).

Sin embargo, las células madre mesenquimales (CMM) derivadas de médula ósea sí están arrojando resultados más contundentes en ensayos clínicos, con una mejora funcional significativa y una reducción de la regeneración tisular aberrante postinfarto, que se traduce en una mejor tolerancia al ejercicio y calidad de vida (73). Es más, el ensayo clínico POSEIDON (74) compara los resultados del trasplante autólogo de CMM frente al alogénico, sin evidenciarse efectos inmunológicos adversos o de otro tipo. En estos últimos casos la vía de aplicación de las CMM fue la transendocárdica en vez de la intracoronaria. Los resultados de estos ensayos abren la puerta a otros más ambiciosos desde el punto de vista clínico.

También se han diseñado estudios clínicos basados en el uso de células madre residentes en el tejido cardíaco (CSC). Existen dos grandes ensayos clínicos cuyos resultados han evidenciado una mejoría significativa en la remodelación cardíaca medida por el tamaño de la escara postinfarto en la resonancia magnética cardíaca. No obstante, solamente uno de ellos (SCIPIO) ha demostrado mejorar de forma

significativa los síntomas, la calidad de vida y la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (75-77).

Las células madre pluripotenciales inducidas (iPS), por otro lado, se están abriendo camino como una línea más a tener en cuenta en el campo de la regeneración miocárdica postinfarto, aunque sólo se tiene constancia de estudio preclínicos en animales (78).

Por último, recientemente se ha comunicado un estudio realizado con primates en el que se demuestra la “remuscularización” del tejido cardiaco dañado tras la aplicación intramiocárdica de cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias humanas en un modelo de infarto agudo de miocardio (79).

Por otro lado, la ingeniería de tejidos está consiguiendo importantes avances, habiéndose llegado a repoblar con diferentes tipos de células, entre ellas células madre, corazones descelularizados manteniendo viable la matriz extracelular como esqueleto para que asienten y proliferen dichas células (80, 81).

#### 1.2.2. Tejido nervioso.

Hoy en día existen numerosas referencias sobre la aplicación clínica de células madre en diferentes grupos de enfermedades neurológicas, por ejemplo, se han publicado terapias con resultados alentadores en la esclerosis lateral amiotrófica (82-85).

En cuanto a la enfermedad de Parkinson, en algunos estudios se han descrito buenos resultados en cuanto a mejora de la sintomatología y de los niveles de fluorodopa en menores de 60 años (84). Otros trabajos muestran resultados no tan brillantes aunque también positivos (86-90).

La esclerosis múltiple es otra de las enfermedades neurológicas diana para el tratamiento con células madre. Existen datos que muestran una mejoría significativa en la agudeza visual y un aumento del área de receptores del nervio óptico (91).

También se ha experimentado con células madre en situaciones de daño de la médula espinal, demostrándose mejoras funcionales en ratas con afectación crónica (92) y en modelos animales porcinos (93). Diferentes ensayos clínicos se están

llevando a cabo en la actualidad en cuanto al daño medular en humanos, observándose mejoras neurológicas tras el injerto intraespinal de poblaciones celulares de médula ósea (92).

En el accidente cerebrovascular, se han descrito beneficios en modelos animales en cuanto al comportamiento y tamaño de la cicatriz postinfarto, tras la infusión por diferentes vías de células madre propias del sistema nervioso y mesenquimales derivadas de médula ósea (93). En estudios clínicos también se ha documentado una reducción del daño neurológico sin importantes efectos colaterales tras el trasplante de CMM (94). Actualmente existen varios ensayos clínicos prometedores en fase I y II en marcha (92).

Al igual que en el tejido cardíaco, algunos de los efectos más estudiados de las CMM son el estímulo para la angiogénesis y para el aumento de las mitosis del tejido perilesional viable mediante la secreción de factores tróficos, la inmunomodulación y el efecto antiinflamatorio. Es decir, se otorga más importancia a la influencia en el proceso reparador que al hecho de que las CMM trasplantadas puedan diferenciarse a células somáticas adultas del órgano dañado (recordemos que en el caso del sistema nervioso, éstas células madre deberían sufrir una transdiferenciación -diferenciación hacia una célula somática de una hoja embrionaria diferente a la de origen-, lo cual ocurre únicamente bajo condiciones muy específicas).

### 1.2.3. Tejido pulmonar.

La administración o trasplante de CMM parece modular la función de las células residentes en el pulmón en el contexto de daño del órgano y subsiguiente reparación. Las vías por las cuales se produce este efecto son el contacto directo y mediante un mecanismo paracrino, a través del cual las CMM secretan diferentes mediadores e incluso transfieren proteínas, ácidos nucleicos y organelas a las células nativas dañadas o que van a participar en el proceso reparador (95, 96).

Para el estudio de los efectos de la terapia con células madre se han diseñado diversos modelos animales de lesiones pulmonares como la Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI), Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), la Bronquiolitis Obliterante (BO), Síndrome de Distrés Respiratorio del Adulto (SDRA) y otros daños

agudos, como la Disfunción Precoz del Injerto (algunos de estos modelos son humanos, derivados de los diferentes sistemas de perfusión *ex vivo* de los pulmones) [97-102].

La aplicabilidad clínica de las células madre sobre las diferentes patologías pulmonares se está evaluando mediante tres estrategias fundamentalmente. Una de ellas es la inyección de células madre bien a través de la vía aérea, bien a través de la arteria pulmonar, con resultados preclínicos alentadores en daño pulmonar agudo inducido (103). Otra es la caracterización y activación de las células madre nativas del pulmón (104). Y, por último, el desarrollo de la ingeniería de tejidos, habiendo llegado a repoblar de células funcionantes la vía aérea e incluso tejido pulmonar descelularizado (105-108).

Conforme a estos resultados preclínicos, se han diseñado ensayos clínicos, algunos de ellos aún en periodo de reclutamiento de pacientes, que tratan de objetivar tanto la seguridad del tratamiento como los posibles beneficios de las células madre en diferentes patologías pulmonares (EPOC, FPI, silicosis, displasia broncopulmonar y SDRA) [109].

#### 1.2.4. Tejido óseo.

La regeneración del tejido óseo se ha centrado fundamentalmente en factores de crecimiento óseo y terapia con células madre expandidas *in vitro*. Sobre la acción de las células madre adultas de hueso quedan áreas que esclarecer en cuanto a caracterización y manipulación.

Se ha demostrado que las células madre mesenquimales (CMM) derivadas de médula ósea tienen una solvente capacidad reparadora en modelos animales, no mediante su diferenciación hacia células osteogénicas (110), sino más bien mediante otros mecanismos como son la quimiotaxis sobre otras células implicadas en la cicatrización, la neoangiogénesis y la inmunomodulación de la respuesta al daño tisular (111, 112). Además, parecen tener un perfil de seguridad satisfactorio en cohortes clínicas de osteogénesis imperfecta (113, 114) y osteonecrosis femoral (115-118).

No obstante, quedan por resolver algunos aspectos antes del paso a la práctica clínica desde estos estudios preliminares, como son la metodología para la extracción, purificación, manipulación y administración de las CMM.

#### 1.2.5. Piel.

En cuanto a la piel, no solo se están desarrollando modelos e injertos sintéticos basados en CMM, sino que también se están explorando otras vías como la administración tópica de estas células. Concretamente, en un estudio en el que se aplica vía tópica CMM en una matriz de fibrina a cinco pacientes con lesiones agudas y a ocho pacientes con heridas crónicas que no cicatrizan, se muestra un aumento en la neoformación de fibras elásticas y una reducción del tamaño de las heridas crónicas (119).

Por otro lado, existe un interés creciente en el uso de células madre derivadas del tejido adiposo para el tratamiento de cicatrices con el objetivo de intervenir en la remodelación defectuosa que la propia cicatrización supone (120, 121).

#### 1.2.6. Cicatrización.

En el proceso de cicatrización participan multitud de células implicadas en la cascada inflamatoria produciendo citoquinas que prolongan la respuesta inflamatoria y que atraen a células productoras de colágenos que conformarán la cicatriz o escara. Tanto las células madre adultas como las células madre mesenquimales han demostrado un papel inmunomodulador en este sentido, facilitando una respuesta inflamatoria “controlada” y pudiendo influir así en la restitución/regeneración del tejido sin formación de escara (122, 123).

En el campo de la cirugía torácica, se han publicado trabajos en modelos animales que demuestran el papel de las células madre mesenquimales en la cicatrización del muñón bronquial con o sin fístula. En un modelo animal en ratas neumonectomizadas se consigue *restitutio ad integrum* de la arquitectura histológica

del muñón bronquial (124). Por otro lado, más recientemente, en un modelo de fístula broncopleural en cabras, se consigue el cierre de la misma tras la aplicación endotraqueal de CMM (125), lo que pone de manifiesto la capacidad de estas células de influir sobre procesos de cicatrización complejos.

#### 1.2.7. Otros.

Las células madre también están siendo utilizadas para mejorar los resultados en el manejo de algunas patologías autoinmunes. En el caso de la *diabetes mellitus* tipo 1 se ha comunicado una mejora en la función de las células beta del páncreas y un descenso en la dosis necesaria de insulina (126). Terapias combinadas de inmunoablación y trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas han producido resultados positivos en términos de dosis requerida por el paciente (127). Es más, este efecto también se ha observado en pacientes a los que se les trasplanta células madre derivadas del tejido adiposo humano (128). Recientemente, y como apuntábamos previamente en la introducción, se han conseguido células productoras de insulina a través de la llamada clonación terapéutica (21).

También se han descrito efectos beneficiosos de la terapia con CMM en modelos animales de otras enfermedades autoinmunes como el Lupus Eritematoso Sistémico, y en modelos animales de sepsis (129).



### 1.3 SÍNDROME DE BRONQUIOLITIS OBLITERANTE (BOS)

Hoy en día, el trasplante pulmonar se ha consolidado como una opción terapéutica válida para algunas de las graves enfermedades terminales que afectan al pulmón y en las que el tratamiento médico se ha llevado al límite (130).

El número de trasplantes pulmonares ha ido aumentando desde sus comienzos en el año 1985. Según el Registro Internacional del año 2014, en el año 2012 se registraron 3719 trasplantes pulmonares en todo el mundo. El diagnóstico más frecuente de los receptores es la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) tipo enfisema (33%), seguido de la Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) (24%) y de la Fibrosis Quística (FQ) (16%). El tipo de trasplante más frecuente es el bilateral, representando el 72% del total de procedimientos (131).

Actualmente, la supervivencia global del trasplante pulmonar a 1, 3, 5 y 10 años se sitúa en torno al 80%, 65%, 53% y 32% respectivamente (131). No obstante, existen diversas complicaciones, descritas en la Tabla 1, que pueden ensombrear el pronóstico de estos pacientes tanto a corto como a largo plazo.

Por otro lado, son varios los problemas o limitaciones que se presentan en relación con el trasplante pulmonar:

- La escasez de órganos: anualmente el número de pacientes que se incluyen en listas de espera es mayor que el número de trasplantes que se realizan, lo que implica listas de espera crecientes. Esto supone una mortalidad en lista de entre el 5 y el 10%. Existen algunas estrategias para intentar paliar esta escasez de órganos, como son las mejoras en los protocolos de manejo del paciente crítico, el uso de donantes subóptimos o marginales, donantes en asistolia controlada (132, 133, 134) y no controlada (135), donante vivo, y la utilización de sistemas de perfusión exvivo que permiten recuperar pulmones a priori no válidos (136).
- La disfunción precoz del injerto (DPI): se presenta en las primeras 72 horas del trasplante y que supone la principal causa de mortalidad a 30 días postrasplante, con una incidencia estimada entre el 10 y el 25% (24,1%) (130, 131, 136).

- El rechazo crónico: es la principal causa de morbi-mortalidad tras el primer año del trasplante. Éste se conoce anatomopatológicamente como “Bronquiolitis Obliterante” (BO) y clínicamente como “Síndrome de Bronquiolitis Obliterante” (BOS, en sus siglas en inglés), y tiene una incidencia del 50% y 76% a los 5 y 10 años respectivamente (130) [Figura 2].

Tabla 1. Causas de muerte más frecuentes en los trasplantes pulmonares de adultos. Tomada del Registro Internacional (ISHLT) del año 2014.

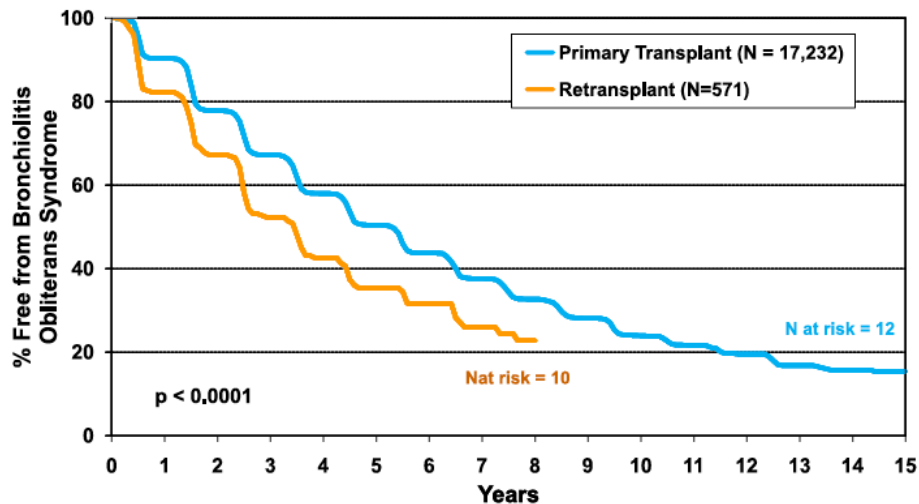
	0 – 30 días	31 días – 1 año	1 – 3 años	3 – 5 años	5 – 10 años
<b>Fallo de injerto</b>	24,1%	16,6%	18,8%	17,9%	16,9%
<b>BOS</b>	0,1%	4,3%	25,1%	29,0%	24,7%
<b>RA</b>	3,4%	1,8%	1,6%	0.6%	0.6%

Fallo del injerto: según el Registro Internacional (ISHLT), puede existir algún error en la clasificación de fallo del injerto. De manera que, además de la DPI (disfunción precoz del injerto), pueden estar incluidas en este apartado otras formas fallo en la función del injerto a medio y/o largo plazo (BOS, RA).

BOS: “Síndrome de Bronquiolitis Obliterante”, BOS en sus siglas en inglés.

RA: Rechazo Agudo

Figura 2. Porcentaje de pacientes libres de BOS tras el trasplante pulmonar. Registro Internacional (ISHLT) del año 2014.



## 1. Definición de BOS

Inicialmente, en los pacientes con deterioro persistente de la función del injerto pulmonar se observó una lesión histopatológica compatible con bronquiolitis obliterante (BO), lo cual se entendió como una manifestación del rechazo crónico de dicho injerto (137). Esencialmente, la BO consiste en un proceso de fibrosis que afecta a la vía aérea pequeña. En las fases más tempranas se observa un infiltrado linfocitario en la submucosa y del epitelio, proceso conocido como bronquiolitis linfocítica (138). El epitelio respiratorio también sufre cambios necróticos y se produce ulceración de la mucosa. Esto desencadena una mayor reacción inflamatoria que resulta en la migración de fibroblastos y miofibroblastos a la luz de la vía aérea, los cuales producen un tejido de granulación que dará lugar a la fibrosis intraluminal que obstruye la vía aérea parcial o totalmente (139). En algunas ocasiones, sin embargo, la única manifestación es un anillo de fibras elásticas rodeando la ya deformada vía aérea (138).

La baja sensibilidad (28%) y especificidad (75%) de la biopsia transbronquial para demostrar la BO (140, 141), asociada a la irregularidad en su presentación histológica hacían necesaria una definición basada en criterios clínicos,

introduciéndose entonces el término BOS (*Bronchiolitis Obliterans Syndrome*). Así, en 1993, la Sociedad Internacional de Trasplante de Pulmón y Corazón (ISHLT, en sus siglas en inglés) propuso un sistema de nomenclatura estandarizado que facilitaba su aplicabilidad clínica (137). En estas recomendaciones se adopta la función pulmonar, inicialmente medida por la evolución del *Volumen Espiratorio Máximo en el primer Segundo* (VEMS o FEV1, en sus siglas en inglés), como el mejor indicador de deterioro del injerto. Más recientemente se introdujo el descenso en el *Flujo espiratorio forzado entre el 25% y el 75% de la capacidad vital forzada* (FEF<sub>25-75</sub>) como marcador precoz de BOS (141-142), puesto que el descenso del FEV1 por debajo del 80% resulta un criterio poco sensible para detectar un deterioro temprano de la función del injerto.

Conforme a todo lo expuesto anteriormente, el diagnóstico clínico de BOS se establece cuando se confirma un deterioro persistente de la función respiratoria medida por el FEV1 durante un periodo de al menos 3 semanas y en ausencia de situaciones clínicas intercurrentes que puedan confundir el diagnóstico, como infecciones, rechazo agudo, complicaciones de la sutura bronquial, recurrencia de la enfermedad de base y otras menos frecuentes (neumopatía esteroidea, enfermedad pleural restrictiva,...). En la Tabla 2 se resumen los criterios clínicos diagnósticos de BOS.

Tabla 2. Clasificación clínica de BOS.

ESTADIO BOS	Criterio FEV1/FEF 25-75
0	FEV1>90% y FEF 25-75>75%
BOS potencial	FEV1 81-90% y/o FEF 25-75<75%
1	FEV1 66-80%
2	FEV1 51-65%
3	FEV1<50%

\*Los porcentajes se refieren al máximo FEV1 y FEF 25-75% postrasplante, determinado por la media de las 2 mejores espirometrías postrasplante separadas entre sí de 3 a 6 semanas.

Aunque la radiología no estaba incluida entre los criterios diagnósticos de la BOS, una TAC en fase espiratoria puede evidenciar atrapamiento aéreo. Este parámetro ha sido relacionado en algunos estudios con el grado y severidad de la BOS (143, 144).

#### Terminología y fenotipos de BOS.

Dada la definición de BOS como deterioro persistente de la función pulmonar postrasplante, podría pensarse que todos los casos de descenso del FEV1 se deben al desarrollo de BOS. Sin embargo, existen otras situaciones clínicas relacionadas con el injerto o no, que cursan de manera similar (Tabla 3) con un deterioro persistente de la función pulmonar.

Por otra parte, se detectó una cohorte de pacientes con un descenso del FEV1 que no encajaban completamente en la definición clásica de BOS. Por este motivo, recientemente se ha introducido el término *Disfunción Crónica del Injerto Pulmonar* (CLAD, en sus siglas en inglés) (145). El diagnóstico de CLAD se establece por criterios espirométricos cuando, al igual que en la BOS, el FEV1 desciende del 80% del FEV1 basal durante 3 semanas o más. Este nuevo concepto nace con la pretensión de englobar todas las formas de disfunción del injerto pulmonar, sean estas potencialmente reversibles o irreversibles. Teóricamente, incluye todos los casos de BOS, pero no debe usarse como un término equivalente ya que, como decíamos anteriormente, existen otras situaciones que cursan con un empeoramiento de la función respiratoria medido por un descenso en el FEV1. Concretamente, se ha identificado un tipo de disfunción crónica del injerto que se caracteriza por ser un trastorno restrictivo de la función pulmonar (RAS, *Restrictive Allograft Syndrome*). El RAS difiere de la BOS en los criterios diagnósticos y requiere un descenso en la TLC de al menos un 10% acompañado de un descenso del FEV1 del 20% o más con un cociente FEV1/FVC normal o aumentado (146, 147). No obstante, el cuadro clínico puede comenzar en el seno de un trastorno obstructivo tipo BOS y hacerse restrictivo en la evolución. Histopatológicamente se produce un daño alveolar difuso seguido de fibrosis en el intersticio y en la pleura visceral, con o sin lesiones tipo BO (148). Este tipo de disfunción se caracteriza por tener peor pronóstico y supervivencia que los pacientes diagnosticados de BOS (146, 147).

Por tanto, con el diagnóstico de CLAD se inicia el estudio de las posibles causas del descenso en la función pulmonar. Si la función respiratoria permanece disminuida tras descartar dichas causas y a pesar del tratamiento, el paciente es clasificado como un fenotipo de CLAD concreto, BOS o RAS.

Existe una entidad que cursa con una caída del FEV1 compatible con CLAD, acompañada de neutrofilia en el lavado broncoalveolar (BAL) que responden al tratamiento con azitromicina (149, 150, 151) recuperándose la función pulmonar. Es la llamada disfunción del injerto neutrofílica reversible, NRAD en sus siglas en inglés. Esta respuesta al tratamiento puede tardar más de las tres semanas que se estiman necesarias para establecer el diagnóstico de CLAD, por lo que este tipo de pacientes puede ser etiquetado inicialmente como CLAD. Sin embargo, tras la respuesta al tratamiento y la mejoría de la función pulmonar, ya no reúne los criterios espirométricos necesarios, por lo que se considera una entidad clínica independiente de CLAD (152).

En cuanto a los fenotipos de la BOS propiamente dicha, se observó que la presentación y evolución clínica puede ser muy variable. Existe un grupo de pacientes en los que el diagnóstico de BOS se establece precozmente tras el trasplante que puede corresponder a un fenotipo de peor pronóstico, con formas severas de BO y rápida progresión (153-156). Otro grupo de pacientes manifiesta una rápida caída de la función pulmonar que más tarde se estabiliza (157). Aquellos pacientes que no responden a la azitromicina pueden corresponder a un fenotipo irreversible caracterizado por lesiones fibroproliferativas tipo BO (149).

Tabla 3. Relación de posibles causas del deterioro persistente de la función pulmonar postrasplante.

1. BOS
2. Procesos aloinmunes no-BOS:
  - a. Rechazo celular agudo
  - b. Bronquiolitis linfocítica
  - c. Rechazo mediado por anticuerpos
3. RAS (Restrictive allograft syndrome, en sus siglas en inglés)

4. Disfunción del injerto que responde a la azitromizina (NRAD o ARAD, en sus siglas en inglés).
5. Complicaciones inflamatorias del injerto:
  - a. Inflamación pleuroparenquimatosa
  - b. Inflamación crónica de la vía aérea
  - c. Inflamación pleural crónica
  - d. Rechazo crónico de origen vascular
6. Infección
7. Resección típica o atípica de algún segmento o lóbulo del injerto pulmonar
8. Anomalía mecánica:
  - a. Broncomalacia o estenosis de la vía aérea
  - b. Compresión del injerto
  - c. Alteraciones ventilatorias (disfunción diafragmática, miopatía)
  - d. Efectos adversos de fármacos
  - e. Edema pulmonar
  - f. Neumonía organizada
9. Obstrucción vascular: estenosis o tromboembolismo
10. Anomalías del parénquima trasplantado
  - a. Recurrencia de la enfermedad de base
  - b. Daño alveolar difuso
  - c. Neumonía organizada
11. Envejecimiento

## 2. Fisiopatología

Los mecanismos últimos que subyacen a la formación de la BO permanecen aún hoy en día escasamente comprendidos. No obstante, se conocen algunas circunstancias que actúan como factores de riesgo asociados a la aparición de la BOS (Tabla 4). En la literatura aparecen divididos en mecanismos aloinmunológicos y no aloinmunológicos y pueden contribuir al desarrollo de la BOS de manera individual o combinados.

Tabla 4. Factores de riesgo (FR) para desarrollar BOS.

PROBABLE FR	POTENCIAL FR
Rechazo agudo	Colonización por <i>Aspergillus</i>
Neumonitis por CMV	Aspiración
Diferencias en el HLA	Infección por CMV (no neumonitis)
Bronquiolitis linfocítica	Anticuerpos específicos contra antígenos del donante
No cumplir el tratamiento	Reactivación del <i>virus de Epstein-Barr</i>
Disfunción primaria del injerto	Reflujo gastroesofágico
	Donante mayor
	Neumonía
	Tiempo de isquemia prolongado
	Infecciones recurrentes (no CMV)

## 2.1 Mecanismos inmunológicos

- Rechazo agudo (RA) grado A2 o mayor y bronquiolitis linfocítica

El rechazo agudo se considera uno de los principales factores de riesgo independientes para el desarrollo de BOS (158-167). Tanto la recurrencia de los episodios de RA como la severidad del episodio y el tiempo transcurrido desde el trasplante se han correlacionado con un riesgo aumentado de BOS (160, 162, 166, 167). En un estudio publicado en 2005 (168), incluso tener un episodio aislado y autolimitado de RA se asocia significativamente con el desarrollo de rechazo crónico. La bronquiolitis linfocítica (rechazo agudo grado B) también se ha identificado como factor de riesgo para el desarrollo de BOS (169, 170).



- Discordancia en los antígenos HLA

Las diferencias entre los HLA del donante y del receptor, tanto en el tipo I como los del tipo II, constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de BOS. Concretamente se han descrito discordancias en los HLA-A (tipo I), -B (tipo I), y -DR7 (tipo II) (171, 172). El mecanismo es un reconocimiento indirecto por parte de los linfocitos CD4+ de las moléculas derivadas de los HLA discordantes expuestas por las células presentadoras de antígenos (APC, en sus siglas en inglés) del receptor. Parece que estos linfocitos CD4+ están mucho más sensibilizados contra las discordancias de las moléculas HLA en pacientes que desarrollan BOS que en los que no lo hacen (173-175).

- Inmunidad humoral

El desarrollo de anticuerpos frente a las moléculas de HLA del donante también tiene un importante papel en la patogénesis de la BOS (176). De hecho, la producción de anticuerpos (Ac) frente a moléculas de HLA tipo I se ha asociado tanto a desarrollo precoz de BOS como a una menor supervivencia del paciente (177-179). Los Ac frente a moléculas de HLA tipo II aunque también participan, tienen un papel aún por concretar (179). Se han descrito, además, otras vías por las cuales estos auto-Ac pueden contribuir a la BOS. Parece que son capaces de inducir en el endotelio pulmonar la producción de factores fibroproliferativos, como el *factor de crecimiento derivado de las plaquetas* (PDGF, por sus siglas en inglés) que promueve el crecimiento fibroblástico (180).

Pero también han sido implicados en el desarrollo de la BOS otro tipo de autoanticuerpos independientes de las moléculas de HLA del donante. Tras la lesión de isquemia y reperusión que sufre el injerto pulmonar se exponen ciertos epítomos de la molécula de colágeno tipo V degradada, los cuales son capaces de inducir la activación de la autoinmunidad en modelos animales de BO (181) y en muestras de trasplantes en humanos (182). De hecho, se ha demostrado que un subgrupo de linfocitos CD4+, los linfocitos Th 17, están sensibilizados contra el colágeno tipo V (183). También se han identificado anticuerpos frente a antígenos (Ag) directos del

epitelio pulmonar, como los Ac anti-K<sub>1</sub> tubulina, que son capaces de estimular el proceso fibroproliferativo (184).

## 2.2. Mecanismos independientes de la aloinmunidad

En cuanto a estos mecanismos, descritos más abajo, existen diferentes teorías sobre cómo participan en el desarrollo de la BOS. Parece que estas lesiones, al afectar al endotelio pulmonar (disfunción primaria del injerto, infección por CMV y reflujo gastroesofágico principalmente) ponen en marcha ciertas “alarmas” actuando como señales de peligro. Teóricamente esto activaría procesos, entre los que está implicada la inmunidad innata, en los que las células presentadoras de antígenos activan a poblaciones de linfocitos T que también se encargan de los mecanismos aloinmunes. Así, la inmunidad innata contribuye a acelerar los procesos alorreactivos que participan en el desarrollo de la BOS (185).

Por otro lado, últimamente se han descrito correlaciones significativas entre BOS con infiltración neutrofílica de la vía aérea y niveles aumentados de IL-8 en el lavado bronquioalveolar (BAL). Esta citoquina ejerce un potente efecto quimiotáctico sobre los neutrófilos y se libera en el epitelio respiratorio y de la vía aérea en respuesta a múltiples estímulos. Uno de estos estímulos es la activación de la inmunidad adaptativa, en cuyo proceso se secreta la citoquina IL-17 por parte de los linfocitos Th-17 antes mencionados (186). Otros estímulos que provocan neutrofilia son los infecciosos y la aspiración ácida. El daño que causan estos neutrófilos sobre el epitelio de la vía aérea es independiente de los mecanismos inmunes y obedece más bien a la sobreproducción de mieloperoxidasas.

- Disfunción Primaria del Injerto (DPI)

El daño de isquemia-reperfusión tras el trasplante pulmonar, o DPI, se considera un factor de riesgo independiente para el desarrollo de BOS (187-189). Es más, la severidad de la DPI se correlaciona directamente con el riesgo de aparición de BOS (190) y con una menor supervivencia postrasplante.

- Infección por virus

Es conocido que el citomegalovirus (CMV) puede promover episodios de RA por varias vías, estimulando la sobreexpresión tanto de antígenos HLA I y II del epitelio respiratorio y del endotelio vascular, como de citoquinas proinflamatorias y de la respuesta aloimmune (191). La relación entre la infección y/o enfermedad por CMV y el desarrollo de BOS sigue siendo un punto controvertido.

Existen estudios que describen la infección por CMV (particularmente la neumonitis por CMV) y la discordancia de riesgo en la serología frente al CMV (donante con serología positiva para CMV y receptor con serología negativa: D+/R-) como un potencial factor de riesgo en el desarrollo de BOS (158, 161, 192-194). Incluso el registro del año 2014 de la ISHLT encuentra una asociación significativa entre la discordancia D+/R- y la mortalidad a 1 y 5 años (131) [Figura 3]. Los propios autores reconocen que las razones subyacentes no están claras pero que éstas pueden incluir efectos inmunogénicos o fibróticos de la activación del virus en el injerto pulmonar.

Otros estudios, sin embargo, no encuentran esa asociación, o lo hacen marginalmente (195). Concretamente un estudio de 2004 (196) demuestra que las neumonías por CMV tratadas correctamente con ganciclovir no representan un factor de riesgo para el desarrollo de BOS, del mismo modo que tampoco lo es la discordancia de riesgo D+/R-. Una de las explicaciones que este trabajo aporta a las frecuentes asociaciones encontradas en las otras publicaciones entre infección por CMV y BOS, es que el aumento de la inmunosupresión por el diagnóstico de BOS provoca la reactivación del virus o la reinfección.

También se han descrito posibles asociaciones entre BOS e infecciones por virus Ebstein Barr y virus herpes 6, aunque con resultados poco concluyentes (197, 198).

- Reflujo Gastroesofágico (RGE)

Son varios los estudios que ponen en evidencia la participación del RGE en el desarrollo de BOS. En algunos de ellos se han detectado la presencia de ácidos

biliares y pepsina en el BAL y se ha correlacionado con la presencia de BOS (199). Un estudio de 2005 del grupo de Toronto asocia una elevación en los niveles de bilis en el BAL con una disminución en el tiempo libre de BOS de los enfermos trasplantados (200).

Se ha demostrado también que el tratamiento del RGE mediante funduplicatura gástrica aumenta el tiempo libre de BOS y mejora la supervivencia (201, 202).

- Otros factores

Las neumonías por bacilos Gram positivos, negativos y por hongos se han descrito también como un factor de riesgo independiente (203).

Otro factor de riesgo para el desarrollo de BOS es la discordancia en la serología (D+/R-) para *Chlamydia pneumoniae* (204). En estos enfermos, la BOS parece sobrevenir antes en el postrasplante. La colonización por *Aspergillus fumigatus* también se ha asociado con mayor incidencia de BOS (205).

Por otro lado, el trasplante bilateral parece ser un factor protector para la aparición de BOS con respecto al unipulmonar (206).

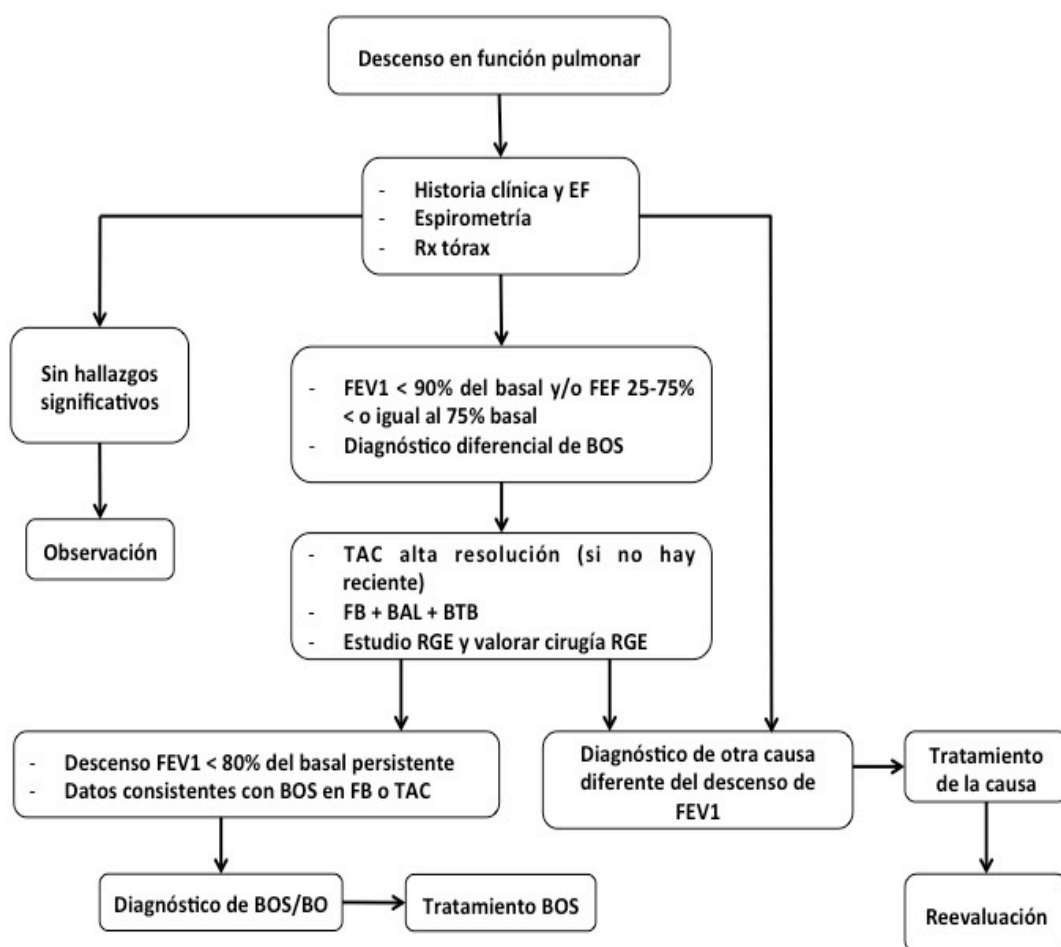
### 3. Diagnóstico de BOS

En el siguiente algoritmo se detalla el proceso diagnóstico propuesto por las guías de práctica clínica editadas por diferentes sociedades científicas (ISHLT, ATS -*American Thoracic Society*-, y ERS -*European Respiratory Society*-) [Figura 3].

Cuando en un paciente se detecta un descenso significativo en el FEV1 se debe hacer una evaluación de la situación clínica con la intención de descartar las posibles causas de disfunción del injerto. Las pruebas de función respiratoria confirmarán el descenso del FEV1 o de los flujos mesoespiratorios (Tabla 2); hay que tener en cuenta que un patrón restrictivo en el estudio de la función pulmonar es compatible con RAS. El TAC de alta resolución puede evidenciar atrapamiento aéreo y bronquiolitis, lo cual apoyaría la sospecha clínica de BOS. La fibrobroncoscopia puede descartar otras causas de patrón obstructivo, como por ejemplo una estenosis de la

vía aérea. Si a un patrón obstructivo en la espirometría se añaden lesiones compatibles con BO en la biopsia transbronquial se confirma el diagnóstico.

Figura 3. Algoritmo diagnóstico de BOS.



EF: Exploración física. FB: fibrobroncoscopia. BAL: lavado broncoalveolar. BTB: biopsia transbronquial. RGE: reflujo gastroesofágico.

#### 4. Prevención y tratamiento

Como decíamos previamente, se desconocen los mecanismos fisiopatológicos últimos que subyacen al desarrollo de la BOS, por lo que las opciones de un tratamiento eficaz son reducidas y conlleva que el manejo diste mucho de estar estandarizado.

Las estrategias de prevención de BOS, por contra, son las que con más probabilidad pueden tener un impacto favorable en la morbilidad y mortalidad a medio-largo plazo en el trasplante pulmonar.

La prevención comienza actuando agresivamente sobre los factores de riesgo del rechazo crónico. Reducir el tiempo de isquemia fría de los injertos, minimizar las transfusiones, la aparición de DPI, usar una correcta profilaxis antiinfecciosa y vigilar la aparición de RGE son importantes medidas a tener en cuenta. Por otra lado, monitorizar la función pulmonar con el FEV1 y el FEF 25-75, las pruebas de imagen y las broncoscopias con lavado broncoalveolar (BAL) son imprescindibles en el seguimiento postrasplante para detectar los signos de BOS lo antes posible.

Las terapias de inducción con antagonistas del receptor de interleucina 2 como el daclizumab o el basiliximab (207), con timoglobulina (208) o con alemtuzumab (209) han demostrado menores tasas de episodios de rechazo agudo, por lo que estos fármacos pueden tener un papel en la prevención del desarrollo de BOS. Por otro lado, este último fármaco, alemtuzumab, se ha usado como tratamiento en un grupo de pacientes con BOS consiguiéndose estabilización de la función pulmonar (210).

Se ha descrito menor incidencia y estabilización de la BOS con el uso de tacrolimus en lugar de ciclosporina, y de micofenolato mofetil en vez de azatioprina en distintas series de casos (211-213), sin embargo este planteamiento no es compartido de forma uniforme en todos los grupos (214).

La incorporación de sirolimus (rapamicina) y otros semejantes (everolimus) a la terapia en pacientes con BOS ha demostrado ser efectiva estabilizando la función pulmonar (215, 216). Igualmente se ha publicado que el cambio del tratamiento con agentes inhibidores de la calcineurina (ciclosporina y tacrolimus) por MMF y sirolimus es capaz de detener el progreso de la BOS (217). Por otro lado, estos fármacos pueden tener un papel importante en la prevención. De hecho, en un ensayo clínico

multicéntrico y aleatorizado realizado en 223 pacientes libres de BOS, se relacionó el uso de everolimus en pauta de mantenimiento con una menor incidencia de RA a los 12 y 24 meses del trasplante, al comparar con pacientes en los que se usó azatioprina. No obstante, también en este estudio, se describió una mayor tasa global de infecciones (218).

La administración de ciclosporina en aerosol ha demostrado mejorar la supervivencia, el periodo libre de BOS y la función pulmonar en los primeros 2 años postrasplante en una serie de pacientes (219, 220). Incluso se ha comunicado un caso de BOS en el que el tacrolimus en aerosol consiguió mejorar la función respiratoria y la oxigenación (221).

La azitromicina es un antibiótico de la familia de los macrólidos que se encuentra también dentro del arsenal terapéutico usado en la BOS. Su efecto es debido a la acción inmunomoduladora y antiinflamatoria más que a su naturaleza antibiótica. Ha demostrado reducir la neutrofilia y los niveles de IL-8 en el BAL en los pacientes con BOS (222). De hecho, la recuperación de la función pulmonar en respuesta al tratamiento con azitromicina define un grupo de pacientes en sí mismo (NRAD). Algún estudio también ha publicado mejoras en el FEV1 con este tratamiento (150) e incluso mejoría en la supervivencia de los pacientes con BOS (223). Como estrategia preventiva, en 2011 se publicó un ensayo clínico en el que se observó que la administración precoz de azitromicina en pacientes trasplantados parece disminuir la incidencia de aparición de BOS (151).

Las estatinas, que tienen propiedades inmunomoduladoras, también son utilizadas, habiendo demostrado reducir el riesgo de BOS en los pacientes trasplantados (224).

La fotoforesis es un tratamiento que se usa en algunas patologías inflamatorias linfocito T dependientes. Esta técnica también ha reportado beneficios en pacientes con BOS, haciendo más lenta la caída del FEV1 a lo largo del tiempo tras el diagnóstico de BOS (225, 226).

Como detallábamos anteriormente, la cirugía antirreflujo puede tener un papel importante en la prevención y tratamiento de los pacientes que desarrollan BOS (201, 202).

Retrasplante. El retrasplante se considera la última medida terapéutica en los pacientes con BOS. Sin embargo, sigue siendo uno de los puntos más discutidos y controvertidos por motivos éticos y prácticos. Se le concede a un paciente una segunda oportunidad en detrimento de otros en lista de espera que aún no han recibido su órgano, y la supervivencia del retrasplante dista aún de ser comparable a la esperada tras una primera intervención en la mayoría de los centros transplantadores. En un trabajo retrospectivo en el que se analizan 205 pacientes retrasplantados entre 2001 y 2006, la supervivencia a 1, 3 y 5 años es de 62%, 49% y 45% respectivamente (227). Otros estudios recientes (2003-2008) aportan una supervivencia a 1 y 5 años postrasplante de 60-75% y 44-62% respectivamente (228-233). No obstante, la indicación del retrasplante debe ser una decisión individualizada poniendo en la balanza los riesgos de mortalidad en el procedimiento frente a la eventual supervivencia que el grupo trasplantador puede aportar.



## 5. Modelos animales de BOS.

Los modelos animales de BOS tratan de imitar la situación clínica que se produce en los pacientes que desarrollan esta complicación. Existen varios modelos que lo consiguen, aunque cada uno tiene sus ventajas e inconvenientes. A continuación se exponen los más representativos en la literatura.

- Trasplante pulmonar ortotópico en ratas

Este modelo se caracteriza por aportar vascularización al injerto y continuidad en la vía aérea del receptor y del donante. Sin embargo, es un procedimiento técnicamente complejo y que requiere de cuidados extra del animal para que sobreviva el tiempo suficiente para desarrollar BOS. Por ello se emplea en estudios de lesiones agudas por isquemia-reperfusión, de daño pulmonar del injerto y para analizar cuestiones inmunológicas (234-237). Sin embargo, hay grupos que ya lo han establecido como modelo de BOS (238).

- Trasplante pulmonar ortotópico en animales grandes

El trasplante experimental en cerdos o perros se usa más como modelo preclínico para adquirir experiencia técnica que para el estudio de la BOS (239). Mantener vivos estos animales hasta que desarrollen BOS con la inmunosupresión adecuada y con el tratamiento antibiótico preciso resulta muy costoso. No obstante, algunos grupos han publicado sus trabajos sobre rechazo crónico en cerdos pequeños (240).

- Trasplante de tráquea heterotópico en ratas

Este modelo consiste en tomar un segmento de tráquea de un individuo e implantarlo en el tejido subcutáneo de otra rata (241), en el epiplón (242) o en el parénquima pulmonar (243, 244). En los dos primeros casos, se trata de un

procedimiento técnicamente sencillo y reproducible que facilita cambios inmunopatológicos sobre el injerto en un periodo corto de tiempo. Sus usos más comunes son los estudios inmunológicos, estudios sobre regeneración del epitelio, sobre remodelación tisular, fibrosis y angiogénesis (245).

Las limitaciones del modelo radican en que el injerto no está vascularizado y está fuera del “ambiente” del tejido pulmonar, por lo que está exento del daño agudo de isquemia-reperfusión y del contacto con el exterior a través de la vía aérea.

Trasplante de tráquea intrapulmonar en la rata. Este tipo de trasplante ofrece la ventaja, frente a los otros modelos heterotópicos, de proporcionar al injerto un ambiente más apropiado y cercano a la realidad del trasplante, en contacto con el exterior a través de la vía aérea del receptor y rodeado de tejido pulmonar (243). Sin embargo, no es un injerto vascularizado y además es necesario un segmento grande de vía aérea para reproducir los resultados, mientras que las lesiones de BOS en la clínica se producen en la vía aérea pequeña. Este modelo se usa fundamentalmente para estudiar respuestas inmunológicas, angiogénesis y cambios fibroproliferativos y de remodelación tisular (244, 246).

En nuestro caso, hemos seleccionado el modelo basado en el trasplante traqueal heterotópico con implantación intrapulmonar porque aúna las ventajas de ser técnicamente sencillo, reproducir la histología de la BOS clínica a corto plazo, y minimiza las limitaciones a la falta de vascularización sistémica del injerto.



## *HIPÓTESIS DE TRABAJO*



## **2 HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Hasta el momento, ningún tratamiento ha demostrado ser efectivo en los pacientes que desarrollan un rechazo crónico tras el trasplante pulmonar, manteniéndose esta complicación como la principal causa de mortalidad postrasplante a medio y largo plazo.

Por otro lado, las células madre mesenquimales han demostrado su capacidad de influir en procesos de reparación y regeneración tisular.

Nuestra hipótesis es que las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea pueden tener un papel en la prevención del desarrollo de la BOS en un modelo animal de rechazo crónico del injerto.



## OBJETIVOS





### **3 OBJETIVOS**

1. Reproducir un modelo animal de rechazo crónico en el trasplante de pulmón.
2. Estudiar el efecto que tienen las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea sobre el proceso de desarrollo del rechazo crónico en un modelo animal.
3. Determinar cuál es la mejor vía de aplicación de las células madre mesenquimales para prevenir el desarrollo de rechazo crónico.
4. Detectar dichas células en el órgano diana (pulmón) y en la zona problema que desarrollará una lesión tipo BOS (injerto traqueal).



## *MATERIAL Y MÉTODOS*



## 4 MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Consideraciones iniciales

#### 4.1.1. Desarrollo del modelo animal de BOS: diseño y resultados

El modelo se planteó haciendo dos grupos, uno en el que donante y receptor eran de la misma especie de rata (Wistar) (WW) (trasplante con isoinjerto), y otro en el que el donante era de la especie Lewis y el receptor de la especie Wistar (LW) (trasplante con aloinjerto). Cada grupo se dividió en 4 subgrupos de 3 animales cada uno en función del tiempo hasta la eutanasia (a los 7, 14, 21 y 28 días respectivamente) (247).

Todos los animales eran machos. Las ratas Lewis tenían un peso medio de  $170 \pm 10$  g (rango, 160-180 g) y las Wistar de  $200 \pm 10$  g (rango, 190-210 g). Los animales tuvieron un tiempo de aclimatación de al menos 7 días antes del procedimiento experimental y su manejo fue acorde con las guías publicadas al respecto (Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio contenidas en el Real Decreto 1201/2005) (248). El comité de uso de animales de laboratorio de nuestro centro aprobó el estudio.

Técnica quirúrgica. Para obtener los injertos de tráquea, las ratas donantes se eutanasiaron con sevofluorano (Sevorane®; Abbott Laboratories, S.A., Madrid) al 8% en una cámara de inducción. La tráquea completa, desde la laringe hasta la carina principal, se extrajo y se dividió en 6-8 segmentos (2-3 anillos por segmento).

Las ratas receptoras se anestesiaron usando inicialmente sevofluorano al 8% en la misma cámara de inducción. La intubación se realizó con un catéter intravascular de 16 GA (Abbott Ireland, Sligo, Ireland) y se ventilaron con una fracción inspirada de oxígeno de 1, una relación inspiración-espriación de 1:2, una presión plateau de 15-20 cm de agua, y a una frecuencia de 30 respiraciones por minuto. Los sujetos receptores también recibieron, como analgesia intraoperatoria, morfina subcutánea (dosis 1 mg/kg) (Braun Medical S.A., Barcelona).

Se realizó una toracotomía izquierda por 6º espacio intercostal. El segmento de tráquea donante se colocó dentro de la luz de un catéter vascular de 10 GA (Abbott

Ireland, Sligo, Ireland) y se introdujo en el lóbulo inferior izquierdo del receptor (Figuras 4 y 5).

Figura 4. Posición de la rata.

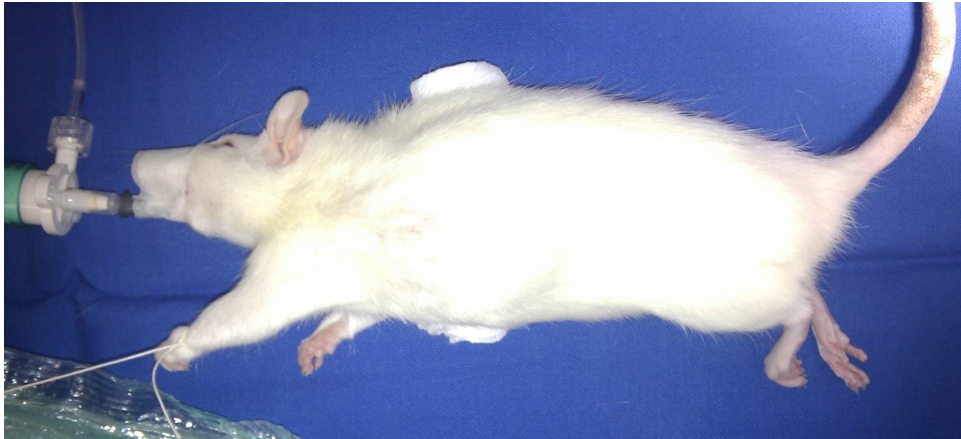


Figura 5. Implante del segmento traqueal en el pulmón izquierdo de la rata receptora.



Tras ello, se cerró el orificio de inserción del injerto con un punto en “x” con monofilamento irreabsorbible de 6/0 (Surgipro®, Tyco Healthcare Group L.P., Norwalk, USA) y se dejó un catéter vascular de 18 GA (Abbott Ireland, Sligo, Ireland) intrapleural hasta el momento de la extubación del animal.

Eutanasia. Los sujetos fueron anestesiados, intubados y ventilados de la misma forma descrita en el apartado anterior.

Se realizó una esternotomía media, extirpando el peto esternocostal para tener una correcta exposición del corazón y grandes vasos. Tras ello, se eutanasió al sujeto con una inyección intracardiaca de 5 ml de cloruro potásico (UCB Pharma, SA, Barcelona, Spain). Se identificó el tronco de la arteria pulmonar a través del cual se inyectó tinta verde. Posteriormente se inyectó tinta negra a través de la aorta descendente de forma retrógrada una vez ligados los troncos supraaórticos y la raíz aórtica para facilitar la salida del tinte por las arterias bronquiales.

Tras este proceso se extrae el segmento traqueal para su fijación en formaldehído durante 24 horas.

Anatomía patológica. Para el análisis histológico, las muestras se incluyeron en parafina y se hicieron secciones seriadas procurando una orientación transversal. Las seriaciones (al menos 15 secciones de 14 micras profundizando cada 10 micras) se tiñeron con hematoxilina-eosina y se visualizaron al microscopio óptico convencional.

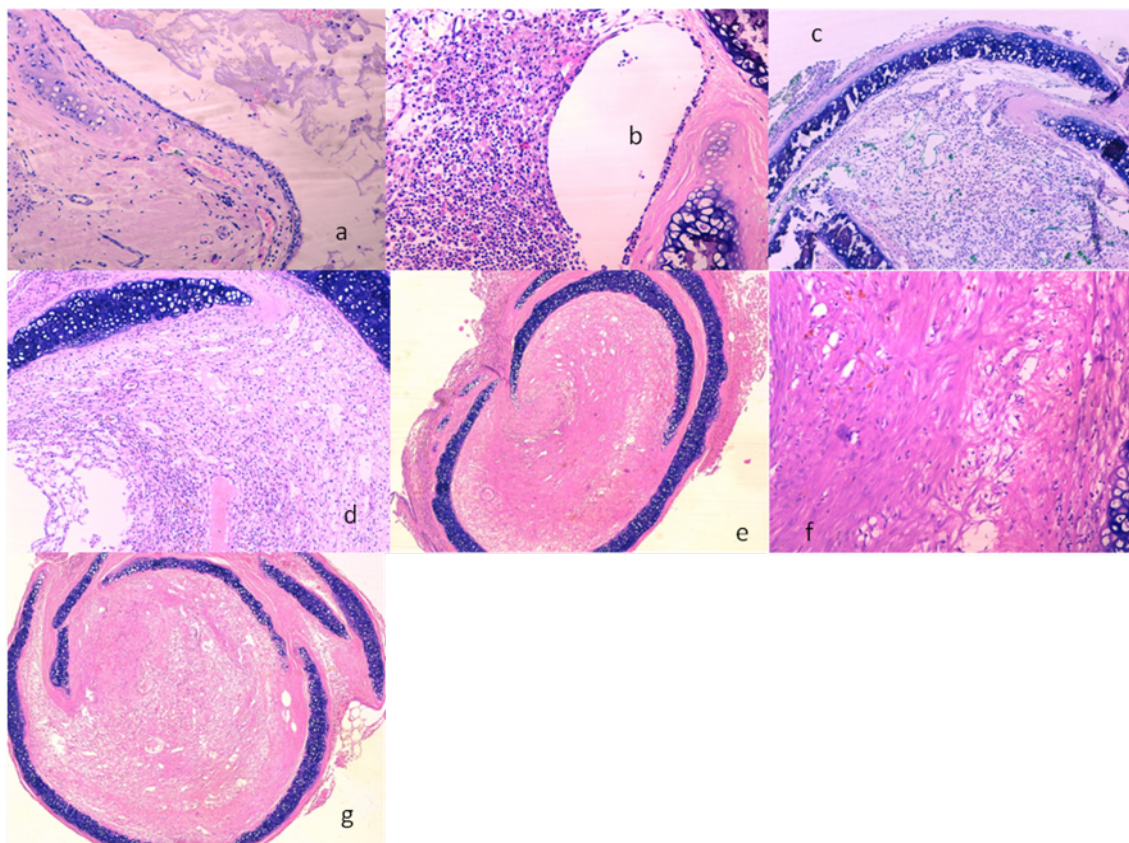
Las variables analizadas fueron: obliteración de la luz traqueal (grado 0: no obliteración; grado 1: obliteración del 0 al 25% de luz; grado 2: obliteración del 25 al 50%; grado 3: obliteración del 50 al 75%; grado 4: obliteración del 75 al 100%), histología definida en 5 patrones (Figura 3), inflamación (0: nula o leve, 1: moderada o 2: severa), fibrosis (0: nula o leve, 1: moderada o 2: severa), neovascularización (0: nulo o pocos vasos de calibre visible y endotelio, 1: presencia moderada de vasos de calibre visible y endotelio, 2: presencia importante de vasos de calibre visible y endotelio), edema (0: nulo o leve, 1: parcheado y 2: difuso), presencia de granulomas de cuerpo extraño, tipo de tinta (verde/negra) y su localización (intra/extravascular).

El análisis de las muestras estaba enmascarado y el anatómo-patólogo no conocía de qué subgrupo procedía cada individuo. El análisis de los datos cualitativos se realizó mediante el test exacto de Fischer. Se utilizó el coeficiente de correlación de



Spearman (no paramétrico) para relacionar variables continuas. Para todas las pruebas se aceptó un nivel de significación  $\leq 0,05$  en contraste bilateral. El análisis de los datos se realizó mediante el programa estadístico SPSS v14.0.

Figura 6. Patrones histológicos.



a) patrón 0, ausencia de lesión (LL 14.3x26; HEx100).

b) patrón 1, presencia de inflamación aguda (IA): proceso obliterativo o no, constituido predominantemente por celularidad inflamatoria de tipo polimorfonuclear neutrófilo, aunque también pueden asociarse macrófagos, linfocitos y células plasmáticas (LW 7.3x32.2; HEx100).

c) patrón 2, tejido de granulación (TG): proceso obliterativo o no, constituido predominantemente por un estroma muy edematoso que contiene gran cantidad de vasos capilares “neoformados” y celularidad inflamatoria de tipo mixto, aunque este es menor que en el patrón de inflamación aguda (LW 7.2x31; HEx40).

d) patrón 3, fibrosis laxa (FL): proceso obliterativo o no, constituido predominantemente por un tejido fibroso prácticamente sin inflamación en el que todavía quedan vasos, aunque en menor número que en el tejido de granulación (LW 14.1x27.3; HEx40).

e) patrón 4, fibrosis densa (FD): proceso obliterativo o no, constituido predominantemente por un tejido fibroso muy colagenizado y sin apenas vasos (LW 21.1x109; HEx25).

f) patrón 4 (LW 21.1x109; HEx200).

g) espectro de lesión, de TG a áreas de fibrosis (LW 21.2x110; HEx25).

Resultados. Ninguno de los animales falleció durante el procedimiento ni el postoperatorio. Durante la eutanasia no se observó ningún signo de infección en la herida ni en la cavidad pleural. No se observaron adherencias pleurales.

En el grupo de isoinjertos (Wistar-Wistar), se observó una gradación temporal en la aparición de fibrosis, objetivándose a los 21 y 28 días postimplante. La histología fue TG a los 21 días y FL a los 28 días. La IA, con destrucción del epitelio, se observó a los 7 y 21 días. El patrón histológico general de la muestra es de IA a los 7 días, indeterminado a los 14 días, TG a los 21 y FL a los 28 días.

En el grupo de aloinjertos (Lewis-Wistar) se observa una obliteración en todos los individuos, siendo total en 7 de 12 individuos. Se identificó fibrosis en todos los subgrupos excepto a los 7 días. La IA aparece solamente a los 7 días; a los 14 días es una FL y a los 21 días es FD, sin observarse cambios a los 28 días con respecto al subgrupo de 21 días. El patrón histológico general de la muestra es de progresión hacia la fibrosis franca, con inflamación aguda y tejido de granulación, pero sin obliteración de la luz a los 7 días; tejido de granulación y fibrosis laxa que oblitera la luz a los 14 días; y fibrosis franca que ocupa la luz traqueal a los 21 y 28 días. Ver tabla 4.

Tabla 4. Resultados de las variables histológicas estudiadas.

<b>INDIVIDUO</b>	<b>OBLITERADO</b>	<b>HISTOLOGÍA</b>	<b>PATRÓN</b>	<b>GRANULOMAS CUERPO EXT.</b>
WW 7.1	2	IA	1	NO
WW 7.2	2	IA	1	NO
WW 7.3	4	IA	1	NO
WW 14.1	0	NO	0	SÍ
WW 14.2	0	NO	0	SÍ
WW 14.3	0	NO	0	SÍ
WW 21.1	0	NO	0	NO
WW 21.2	3	TG	2	SÍ
WW 21.3	0	TG	2	SÍ
WW 28.1	4	TG	2	NO
WW 28.2	3	FL	3	NO
WW 28.3	4	FL	3	NO
<b>LW 7.1</b>	<b>3</b>	<b>IA -&gt; TG</b>	<b>1</b>	<b>NO</b>
<b>LW 7.2</b>	<b>4</b>	<b>TG</b>	<b>2</b>	<b>SÍ</b>
<b>LW 7.3</b>	<b>3</b>	<b>IA</b>	<b>1</b>	<b>NO</b>
<b>LW 14.1</b>	<b>4</b>	<b>TG-&gt;FL</b>	<b>2</b>	<b>SÍ</b>
<b>LW 14.2</b>	<b>3</b>	<b>TG-&gt;FL</b>	<b>2</b>	<b>NO</b>
<b>LW 14.3</b>	<b>3</b>	<b>FL-&gt;FD</b>	<b>3</b>	<b>SÍ</b>
<b>LW 21.1</b>	<b>4</b>	<b>FD</b>	<b>4</b>	<b>NO</b>
<b>LW 21.2</b>	<b>4</b>	<b>FD</b>	<b>4</b>	<b>SÍ</b>
<b>LW 21.3</b>	<b>4</b>	<b>FL-&gt;FD</b>	<b>3</b>	<b>SÍ</b>
<b>LW 28.1</b>	<b>4</b>	<b>FL-&gt;FD</b>	<b>3</b>	<b>SÍ</b>
<b>LW 28.2</b>	<b>3</b>	<b>FL</b>	<b>3</b>	<b>SÍ</b>
<b>LW 28.3</b>	<b>4</b>	<b>FL/TG</b>	<b>3</b>	<b>NO</b>

WW= Wistar-Wistar; LW=Lewis-Wistar; IA: Inflamación Aguda; TG=Tejido de Granulación;  
FL=Fibrosis Laxa; FD: Fibrosis Densa

Comparando los resultados de los dos grupos en cuanto al grado de obliteración del segmento traqueal (grados de 0 a 4), se observa que los individuos del grupo LW presentan una mediana de 4, mientras que en los individuos WW es de 3. En el grupo del aloinjerto (LW) se observa un grado de obliteración 3 ó 4 (rango 50-100% de obliteración) en todos los individuos, siendo de grado 4 en 7 de 12 casos. En el grupo WW únicamente 7 individuos presentan obliteración de la luz del segmento traqueal (grados 2 a 4), y en 5 casos no se observa obliteración. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p=0.010$ ).

Excluidos los animales que fueron eutanasiados a los 7 días, se observa que el 77,8% de los Lewis-Wistar presenta patrones histológicos 3 y 4 (fibrosis laxa y/o densa) frente al 22,2% de los individuos Wistar-Wistar ( $p=0.057$ ).

En el estudio de correlación entre el tiempo y el patrón que se objetiva en la preparación histológica, se obtiene un coeficiente de correlación (Rho de Spearman) de 0.62 ( $p=0.033$ ) en el grupo Wistar-Wistar, y un coeficiente de 0.75 ( $p=0.005$ ) en el grupo Lewis-Wistar.

El tinte verde se objetiva en ambos grupos desde fases precoces de la lesión en estructuras vasculares, predominantemente en el tejido de granulación, y en los capilares alveolares peri-injerto, y se identifica con más dificultad conforme la histología avanza hacia la fibrosis franca. El tinte negro no se objetiva intravascular en ninguno de los casos.

En resumen, el modelo animal de BOS se obtuvo de los implantes de segmento traqueal de una rata Lewis dentro del parénquima pulmonar de una rata Wistar con eutanasia a los 21 días (LW21). La aplicación de tintes de diferentes colores por vía sistémica y pulmonar nos ayudó a decidir cuál era la mejor vía de aplicación de células madre mesenquimales. Al encontrar el tinte verde (arteria pulmonar) en la neovascularización del injerto, se decidió que ésta sería una de las vías de aplicación.

El número de individuos del subgrupo LW21 se amplió a 5 para poder establecer comparaciones con los subgrupos que recibieron células madre por diferentes vías (ver siguiente apartado).

#### 4.1.2. Trasplante de células madre mesenquimales sobre el modelo animal de BOS

Se han utilizado 45 ratas Wistar hembra (Harlan Interfauna Ibérica SL, Barcelona, España), de  $200 \pm 10$  g (190–210 g) de peso y 3 meses de edad. Además, se usaron 6 ratas Lewis como donantes con un peso medio de  $170 \pm 10$  g (rango, 160-180 g).

Las 45 ratas receptoras se dividieron en 3 grupos de 15. A todas ellas se les implantó un segmento traqueal de 2-3 cartílagos de longitud obtenido de las ratas Lewis a las que se les extrae previamente la tráquea completa (tal y como se describe en la descripción del modelo, en el apartado anterior). Cada uno de los individuos de estos grupos recibirá un trasplante de células madre mesenquimales (CMM) a diferentes tiempos y por diferentes vías de administración (Figura 7).

De esta forma obtenemos 3 grupos de ratas dependiendo del tiempo de trasplante de CMM:

- G0: trasplante de CMM a tiempo 0 (es decir el mismo día en que se implanta el segmento traqueal). 15 individuos.
- G7: a tiempo 7 (a los 7 días del implante del segmento traqueal). 15 individuos.
- G14: a tiempo 14 (a los 14 días del implante). 15 individuos.

A su vez, cada grupo se divide en 3 subgrupos dependiendo de la vía de administración de las CMM:

- Vía Intraparenquimatosa (P), 5 ejemplares/subgrupo.
- Vía intratraqueal (T), 5 ejemplares/subgrupo.
- Vía intravascular (V), 5 ejemplares/subgrupo.

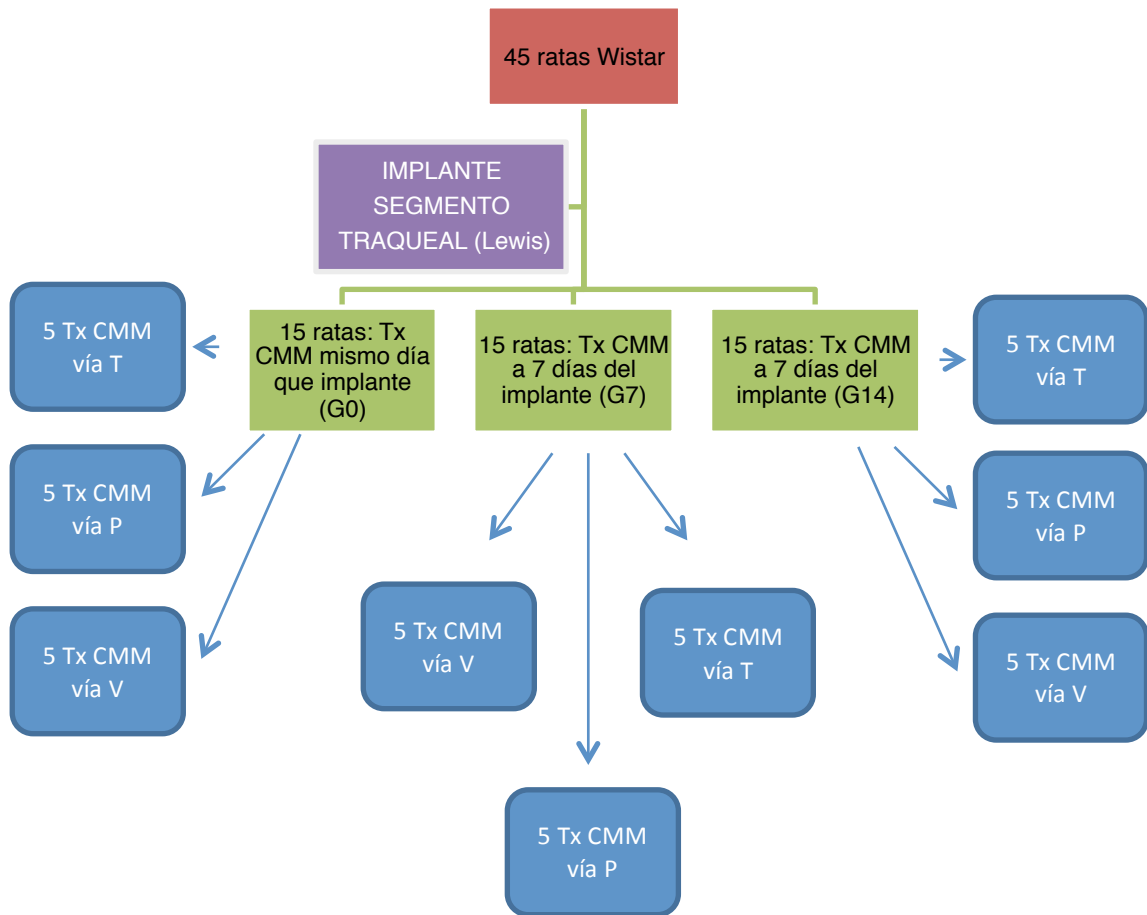
Todas las ratas se sacrificaron a los 21 días, de acuerdo al modelo de BOS que hemos reproducido en nuestro laboratorio (ver apartado 1.1)

Los animales fueron estabulados en cajas de Plexiglas, sobre un lecho de virutas de madera, con acceso libre a comida y agua. Las condiciones ambientales en las que se mantuvieron fueron constantes, con una temperatura ambiente de  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$

y una humedad relativa del 50-70%, alternando 12 horas de luz con 12 horas de oscuridad. El tiempo de aclimatación de los animales fue de al menos 7 días y fueron manejados con arreglo a las guías para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (Real Decreto 1201/2005, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (248)).

El proyecto fue aceptado por el Comité para el Cuidado de Animales del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda.

Figura 7. Esquema explicativo del estudio.



**Tx CMM:** Trasplante de células madre mesenquimales; **P:** Vía intrapulmonar; **T:** Vía intratraqueal; **V:** Vía intravascular

#### 4.2 Extracción de células madre mesenquimales (CMM) de la médula ósea de rata

A continuación se detalla el material, equipos de laboratorio, y los medios de cultivo utilizados:

- MATERIAL:
  - Material quirúrgico estéril
  - Agujas de 20 G (BD Eclipse Needle 256 Lakes, USA)
  - Agujas de 25 G (BD Eclipse Needle 256 Lakes, USA)
  - Jeringuillas de 1 ml (BD Discardit II, Huesca, España)
  - Jeringuillas de 2 ml (BD Discardit II, Huesca, España)
  - Solución antiséptica: Hibimax 5% Clorhexidine (Regent Medical, Burnaby Canada) y curadona (Lainco, S.A. Barcelona, España)
  - Cloruro potásico (Braun Vetcare, Alemania)
  - Micropipetas de 2-20  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l y 100-1000  $\mu$ l (Eppendorf Research, España)
  - Puntas para micropipetas de 2-20  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l y 100-1000  $\mu$ l (Daslab, Nirco, Barcelona, España)
  - Tubos de 2 ml (Eppendorf Research, España)
  - Cámara de Neubauer (Brand, Alemania)
  - Tubos de 50cc estériles (Falcon, Madrid, España)
  - Azul tripán al 0,4% (Sigma aldrich, Madrid, España)
  - Pipetas serológicas de 5, 10, 25 cc (Daslab, Nirco, Barcelona, España)
  - Medio  $\alpha$ -MEM (Gibco BRL Co. Ltd, Grand Island, NY, USA)
  - Malla de nylon de 70 micras (Falcon Madrid, España)
  - Suero Fetal Bobino (Lonza Verviers Sprl, Bruselas, Bélgica)
  - Antibiótico (Lonza Verviers Sprl, Bruselas, Bélgica)
  - Tripsina 0.25%/1mM EDTA (Lonza Verviers Sprl, Bruselas, Bélgica)
  - Glutamina (Lonza Verviers Sprl, Bruselas, Bélgica)
  - Hepes (Lonza Verviers Sprl, Bruselas, Bélgica)
  - Placas p60 estériles (Nunc, Nirco, Madrid, España)
  - Sevofluorano Sevorane (Abbot, laboratorios, Madrid, España)
  - Buffer fosfato salino 10 X (Lonza Verviers Sprl, Bruselas, Bélgica)
  - Pipetas Pasteur de vidrio estériles (Daslab Nirco SL, Barcelona, España)



- Cubreobjetos (Menzel-Glaser Braunschweig, Barcelona, España)
- Frascos de cultivo estériles de 75 cm<sup>2</sup> (Nunc, Thermo scientifics Madrid, España)

- EQUIPOS:

- Incubador de CO<sub>2</sub> Autoflow (Nuaire, Plymouth, USA )
- Campana de flujo laminar (Nuaire, Plymouth, USA)
- Pipeteador automático (Bibbyjet pro, OSA, UK)
- Estufa a 37°C (Memert, Fisher Scientific, España)
- Microscopio de luz invertida (Euromex Holanda)
- Centrífuga de sobremesa Hemle Z300K (Fisher scientific, Madrid, España)
- Microscopio de contraste de fases (Olympus, España)
- Baño termostático a 37°C con agua estéril (Grant, Cambridge, United Kingdom)

- MEDIOS DE CULTIVO:

1. Medio de cultivo de recolecta

- Medio  $\alpha$ -MEM
- Suero Fetal bovino al 2.5 %
- Solución antibiótica al 1,2 %

2. Medio de cultivo de siembra

- Medio  $\alpha$ -MEM
- L-Glutamina al 2,2 %
- Solución antibiótica al 1,2 %
- HEPES al 2,2 %
- Suero Fetal bovino al 20 %

3. Medio de cultivo de expansión

- Medio  $\alpha$ -MEM

- L-Glutamina al 2,2 %
- Solución antibiótica al 1,2 %
- HEPES al 2,2 %

Las CMM se extrajeron de la tibia y del fémur de ratas macho Wistar adultas de entre 250-300g de peso. Los animales se anestesiaron con sevoflurano (Sevorane®; Abbott Laboratories, S.A., Madrid, España) al 8% y un flujo de oxígeno de 5 l/min que se mantuvo hasta el final de la extracción de ambas tibias y fémures. Este procedimiento se realizó en condiciones estériles, rasurando previamente las extremidades y lavándolas a continuación con una solución antiséptica (clorhexidrina 0.5%). Al finalizar se llevó a cabo la eutanasia mediante la inyección intracardiaca de 5 ml de cloruro potásico (UCB Pharma, SA, Barcelona, España).

Las tibias y los fémures se colocaron en un tubo estéril de 50 cc con 30cc de medio de recolecta atemperado a 37°C. Para llevar a cabo el lavado de las tibias y los fémures, éstos se transfirieron a una placa p60 con 4cc de medio de recolecta nuevo también atemperado a 37°C y que se había colocado dentro de la cabina de flujo laminar sobre una placa calefactora que nos asegura el mantenimiento de las muestras a esa temperatura. A continuación con una jeringuilla de 2 cc vacía y una aguja de 20G se perforaron las epífisis de todos los huesos (Figura 8) y se lavó el interior de los mismos (epífisis y diáfisis), haciendo pasar el medio de cultivo de siembra por toda su longitud. La médula ósea se fue recolectando (Figura 9) en esta última placa y posteriormente se homogeneizó el medio de cultivo junto con la médula ósea con ayuda de una micropipeta. La suspensión celular obtenida se filtró haciéndola pasar por una malla de 70 micras para eliminar los restos óseos (Figura 10) y se resuspendieron las células en un volumen total de 5cc de medio de cultivo de siembra.

Una muestra de la suspensión celular obtenida se utilizó para llevar a cabo el recuento de células y su viabilidad utilizando el test de azul tripán. Para este test se recogió una alícuota de 200  $\mu$ l de la suspensión celular y se añadieron 200  $\mu$ l de una solución de azul de tripán al 0,4%. Ambas se mezclaron y se cargaron 20  $\mu$ l de la muestra en una cámara de Neubauer para proceder al recuento sobre un microscopio

de campo claro (las células no viables estarán teñidas de azul). El recuento final de las células se obtuvo mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$N = \frac{(A+B+C+D)}{4}$$

- Donde A, B, C y D son el número celular contado en cada una de las cuatro cuadrículas que forman la cámara.
- Donde N es la media del número de células obtenido entre las 4 cuadrículas.

**Número total de células** =  $0, N \times 10^6 \times \text{factor de dilución con el azul tripán} \times \text{ml totales de muestra}$ .

La viabilidad se obtuvo mediante la aplicación de la siguiente fórmula y hallando la media de las 4 cuadrículas:

$$\text{Viabilidad} = \frac{\text{Células viables}}{\text{Células viables} + \text{Células no viables}}$$

Las células obtenidas se sembraron en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> conteniendo 20 cc de medio de siembra a una concentración de 160.000 células por cm<sup>2</sup> (Figura 11). Los frascos se incubaron en la estufa de CO<sub>2</sub> al 5%, a 37°C y 100% de humedad. A las 72 horas de la incubación, el sobrenadante conteniendo restos celulares y células no adherentes fue eliminado con ayuda de una pipeta serológica, de forma que quedaron en el frasco solo las células adherentes. Posteriormente el cultivo se lavó al menos dos veces con buffer fosfato salino (PBS, en sus siglas en inglés) con un pH de 7.4, estéril y a temperatura a 37°C, añadiendo a continuación 12 cc de medio de siembra nuevo. A partir de este momento el medio de cultivo se reemplazó cada 48 horas hasta que las células alcanzaron una confluencia aproximada del 95%. El seguimiento del crecimiento celular se llevó a cabo mediante la observación de los frascos de cultivo con un microscopio óptico invertido de contraste de fases.

Una vez que las células alcanzaron la confluencia, se retiró el medio de cultivo y se lavaron 2 veces con PBS 1X. Una vez retirado el PBS, se sometieron a una incubación con 3 ml de tripsina 0.25%/1mM de ácido de etilendiaminotetraacético (EDTA, Lonza Verviers Spri, Bruselas, Bélgica) durante 4-5 minutos a 37°C. Tras este periodo de incubación se inactivó la tripsina con 6 ml de medio de recolecta y las células obtenidas se centrifugaron 2 veces a 1200 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos. El “pellet” obtenido fue diluido en medio de expansión, se sometió a recuento mediante el test de viabilidad de azul tripán y las células madre obtenidas se sembraron de nuevo en frascos de cultivos a una concentración de 15.000 células/cm<sup>2</sup> en presencia de medio de cultivo de expansión.

Figura 8. Extracción de la médula ósea de fémures y tibias donantes.

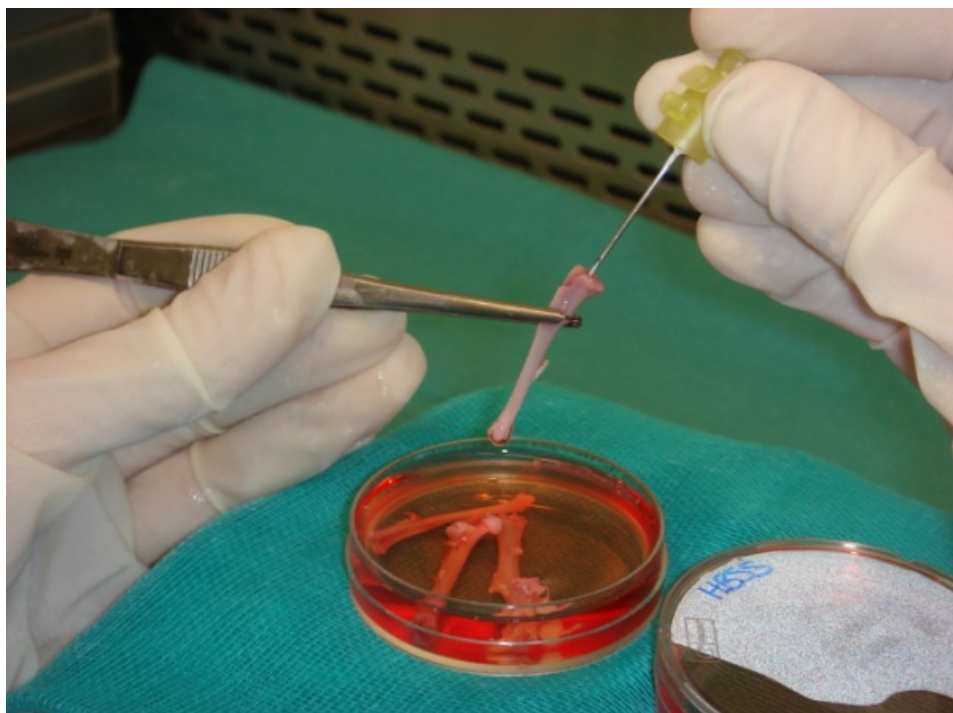


Figura 9. Fragmentos de médula ósea en medio de cultivo.

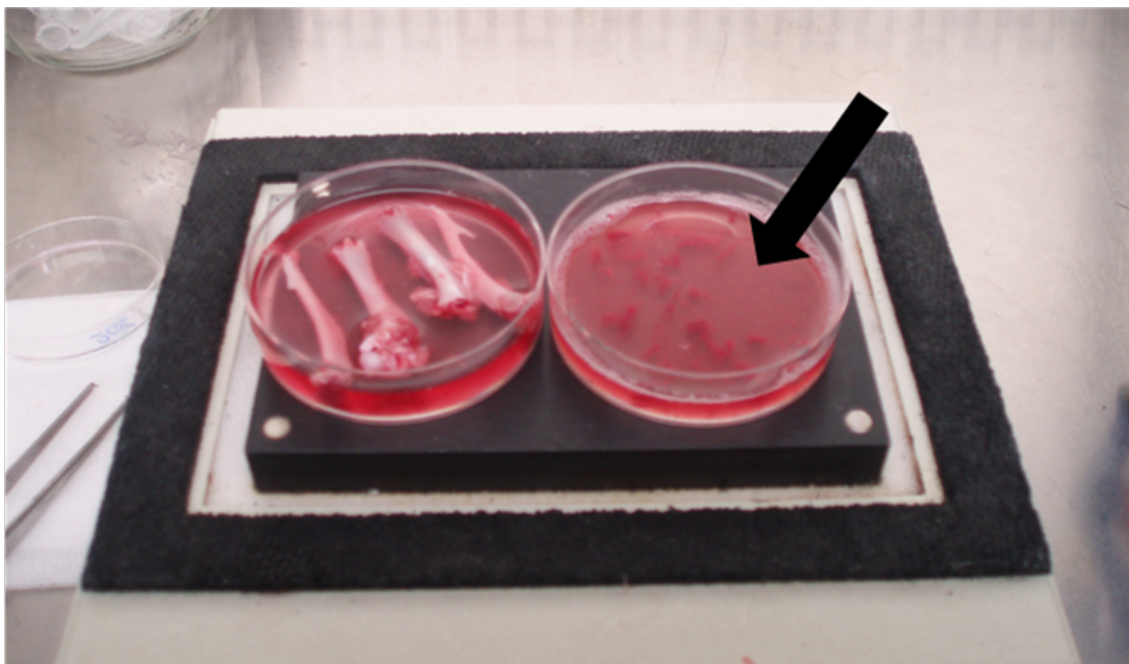


Figura 10. Filtrado de médula ósea para eliminación de restos óseos.

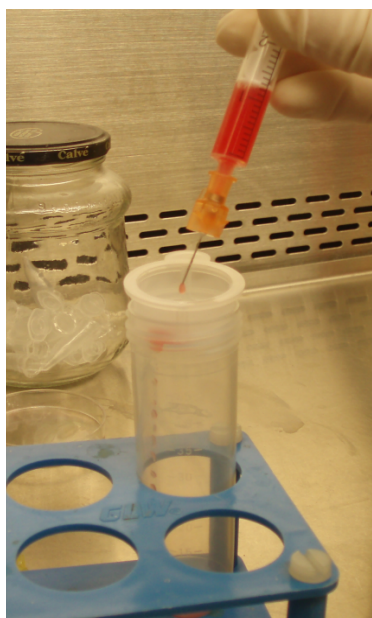
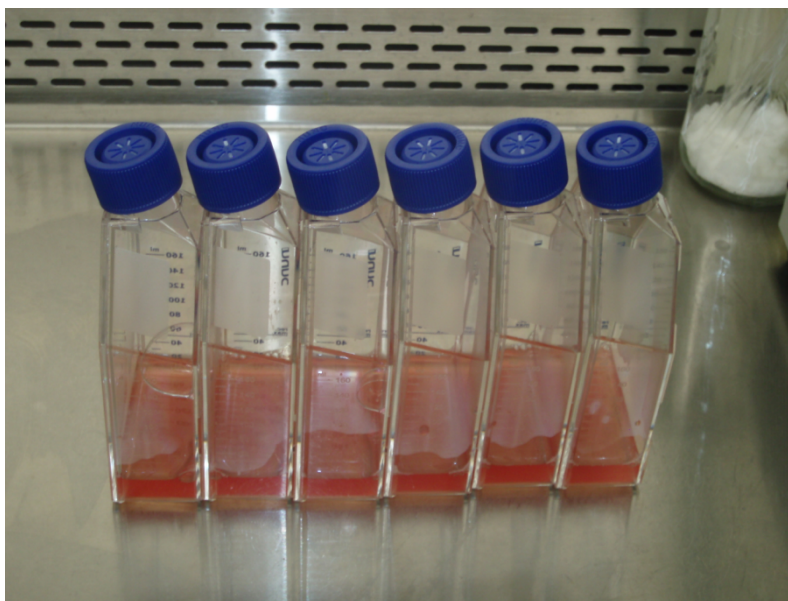


Figura 11. Células sembradas en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>.



#### 4.3 Caracterización de las CMM por citometría de flujo (CMF)

Una vez levantados los cultivos, tal como se indica en el apartado anterior, una pequeña muestra de células fue derivada para realizar el correspondiente estudio fenotípico. Para el análisis de citometría las células fueron separadas con tripsina y marcadas con anticuerpos primarios conjugados con isotiocinato de fluoresceína (fluorescein isothiocyanate, FITC, en sus siglas en inglés), ficoeritrin (phycoerythrin, PE, en sus siglas en inglés) o Alexa 647. Los siguientes marcadores de superficie celular se utilizaron para caracterizar las células en cada pase: CD11b, CD29, CD31, CD45 y CD90 con el apropiado control isotópico conjugado con un fluorocromo (todos los anticuerpos de AbD Serotec, Oxford, UK). Cada anticuerpo es específico de marcadores en rata.

Se realizó un protocolo estándar de manejo para marcar las CMM. Se resuspendieron 10<sup>6</sup> células/mililitro en Running Buffer (RB; Miltenyi Biotec GmbH, Gladbach, Germany) y se incubaron con el anticuerpo primario (1:10, v/v) durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente las células se lavaron con RB y se centrifugaron durante 7 minutos a 4°C, el pellet resultante se resuspendió nuevamente en 0.5 mL de

RB. Para detectar las células muertas y poder así eliminarlas del estudio se añadieron 5  $\mu$ L de Ioduro de propidio (Southernbiotech, Birmingham, AL, USA) en todos los experimentos realizados. El análisis de citometría se realizó en un citómetro Cytomics FC500 MPL y los resultados obtenidos se analizaron con CFC 500MXP, version 2.2 (Beckman Coulter Inc.; Miami, FL, USA).

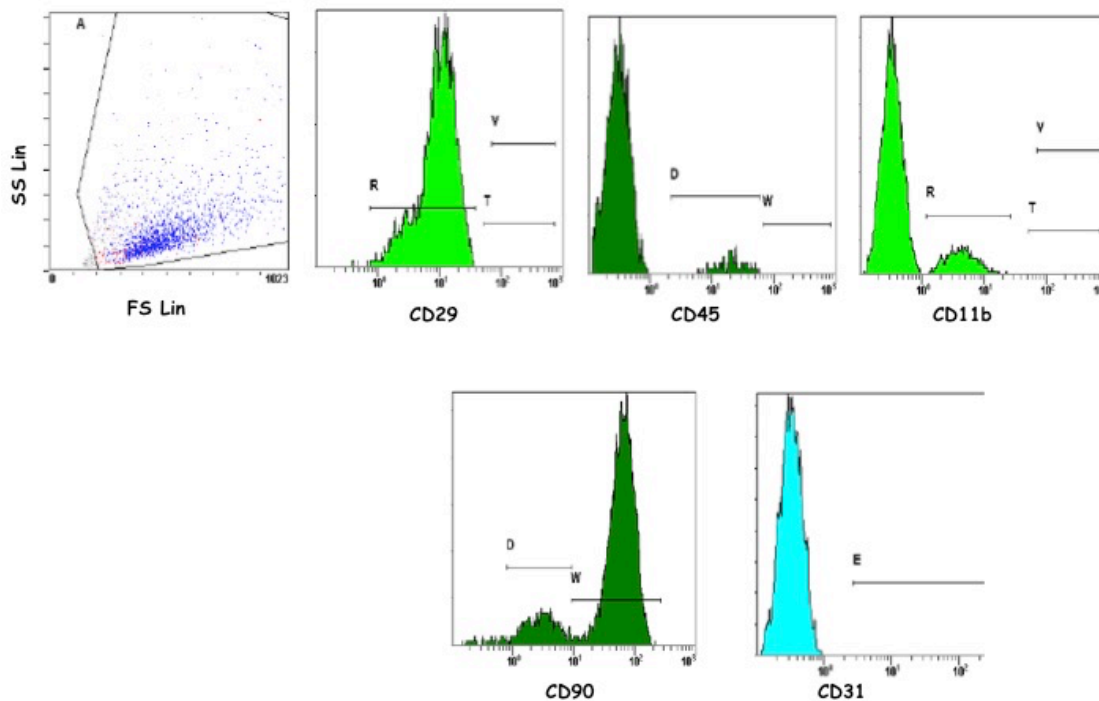
Las diferentes poblaciones celulares de los cultivos de CMM fueron identificadas basándose en diagramas de tamaño/complejidad (forward/side scatter, FSC/SSC, en sus siglas en inglés). Los cultivos de células típicamente mesenquimales deben expresar  $\geq$ 95% de CD29 y CD90 y deben tener una expresión  $\leq$ 5% de CD11b, CD45 o CD31. Las colecciones de datos adquiridos se analizaron con el software CXP (version 2.1; Beckman Coulter Inc).

A continuación se detalla la batería de anticuerpos utilizada para la caracterización por citometría de flujo:

- Isotipo IgG (H) Flourescein isothiocynate (FITC) (AbD Serotec, Oxford, UK)
- Isotipo IgG1 Phycoerythrin (PE) (AbD Serotec, Oxford, UK)
- Isotipo IgG1 Alexa 647 (AbD Serotec, Oxford, UK)
- CD29 FITC (IgG(H) (AbD Serotec, Oxford, UK)
- CD11b FITC (IgG2a) (AbD Serotec, Oxford, UK)
- CD49e AL.647 (IgG(H) (AbD Serotec, Oxford, UK)
- CD90 PE (IgG1) (AbD Serotec, Oxford, UK)
- CD31 AL.647 (IgG1) (AbD Serotec, Oxford, UK)
- CD 45 PE (IgG1) (AbD Serotec, Oxford, UK)

Una vez adquiridas las células, se procedió a su análisis para determinar el porcentaje de expresión de los antígenos de superficie de las CMM (Figura 12).

Figura 12: Caracterización fenotípica de CMM por CMF.



MARCADOR	CD29 FITC	CD45 PE	CD11b FITC	CD90 PE	CD31 AL647
SEÑAL	96,33%	1,41%	1,72%	95,2%	0,05%
				17,72% (-)	
				77,48% (+)	



Sólo las CMM que permanecieron menos de 5 semanas en cultivo y con características fenotípicas típicas de CMM con una viabilidad mayor de un 95% se utilizaron para realizar los diferentes tratamientos (Tabla 5).

Tabla 5. Criterios de selección de las CMM utilizadas para realizar los estudios de terapia celular.

	<b>CMM</b>
<b>Tiempo en cultivo</b>	$\leq 5$ semanas en cultivo
<b>Características fenotípicas</b>	Expresión $\geq 95\%$ : CD29 y CD90 Expresión $\leq 5\%$ : CD11b, CD45 o CD31
<b>Viabilidad</b>	$\geq 95\%$

#### 4.4 Preparación de las CMM para el trasplante

Una vez que los cultivos han alcanzado una confluencia mayor o igual al 90% y habiendo conseguido el número de CMM necesarias se procede a la preparación de las células para el trasplante.

Las células se levantan de las factorías mediante tripsinización. Para ello primero se retira el medio de cultivo de la factoría con una pipeta Pasteur con sistema de vacío. Tras 2 lavados con PBS 1x atemperado a 37°C añadiendo 20 ml con una pipeta serológica de 25 ml, se añade a cada factoría de cultivo 28 ml de Tripsina 0.25%/1mM EDTA, repartiéndose por los dos pisos y se incuba durante 5 minutos a 37°C. Tras esta incubación, la tripsina se inactiva con medio  $\alpha$ -MEM completo/2,5% FBS. Se debe transferir equitativamente la suspensión celular de cada factoría a dos tubos cónicos de 50 ml. Después, se someten a centrifugación durante 15 minutos a 1200 rpm y las células obtenidas son lavadas al menos dos veces con medio  $\alpha$ -MEM al 2.5%/FBS, centrifugando a 1000 rpm durante 5 minutos cada lavado. Finalmente el

“pellet” obtenido se diluye en suero fisiológico y se realiza un recuento con azul tripán en la cámara de Neubauer, tal y como se describe en el apartado 2. *Extracción de células madre mesenquimales (CMM) de la médula ósea de rata.*

Tras ello, y bajo la campana de flujo laminar, las células se colocan en una jeringuilla de 1 ml suspendidas en un medio compuesto por plasma rico en plaquetas de la propia rata receptora (ver obtención de dicho plasma en el siguiente apartado). La concentración y el volumen de la solución que contiene las células dependerán de la vía de administración, como se detalla más adelante en el apartado 6. *Trasplante de células madre mesenquimales.*

- Obtención de plasma rico en plaquetas (PRP)

El PRP óptimo para ser utilizado de cara a un trasplante es aquél cuyo concentrado de plaquetas sea 4 veces mayor que el recuento inicial.

Para la obtención del plasma los animales fueron anestesiados en el quirófano con sevoflurano (Sevorane®; Abbott Laboratories, S.A., Madrid) al 8% con un flujo de oxígeno de 5 l/minuto manteniéndose después un flujo de sevoflurano al 2% y oxígeno. Tras extraer 500  $\mu$ l de sangre de la vena de la cola mediante un catéter vascular de 24G (Abbott Ireland, Sligo, Ireland) y una jeringuilla de 1ml ambos previamente tratados con citrato sódico para evitar así fenómenos de coagulación sanguínea, la sangre se traspasó a un tubo de 2 ml realizando sucesivas centrifugaciones para separar las fracciones sanguíneas de menor a mayor densidad. Las muestras se centrifugaron primero a 4100 G durante 15 minutos para separar el plasma y los leucocitos de los hematíes sanguíneos. Finalizados los 15 minutos de centrifugación mediante micropipeteado, se aspiró de forma progresiva el sobrenadante que cubre el sedimento de elementos formes sanguíneos (hematíes) trasvasándolo a otro tubo y centrifugándolo a 300 G durante 6 minutos para separar la fracción plasmática de los leucocitos. Posteriormente se aspiró de forma progresiva la fracción plasmática y se traspasó a un tercer tubo que se sometió a una última centrifugación a 4600 G durante 15 minutos para obtener un concentrado de plaquetas. A continuación, el sobrenadante conteniendo la fracción plasmática se traspasó a un criotubo de 1.8 cc y se sometió a dos ciclos de congelación en nitrógeno

líquido/descongelación a 37°C para lisar las plaquetas. Posteriormente la muestra se centrifugó a 14.000 g durante 20 minutos para eliminar las membranas plaquetarias y el producto restante se congeló a -20°C hasta el día del implante.

#### 4.5 Cirugía: implante del segmento traqueal

La cirugía del implante del segmento traqueal se realizó siguiendo las mismas pautas y pasos que los descritos en el apartado 1.1: *Desarrollo del modelo animal de BOS: diseño y resultados; Técnica quirúrgica*.

#### 4.6 Trasplante de células madre mesenquimales

Las dosis de CMM que se trasplantaron fueron:

- Vía intrapulmonar (P): 15 millones de células suspendidas en 250 µL de plasma.
- Vía intratraqueal (T): 7 millones de células suspendidas en 500 µL de plasma.
- Vía intravascular (V): 1.5 millones de células suspendidas en 300 µL de plasma.

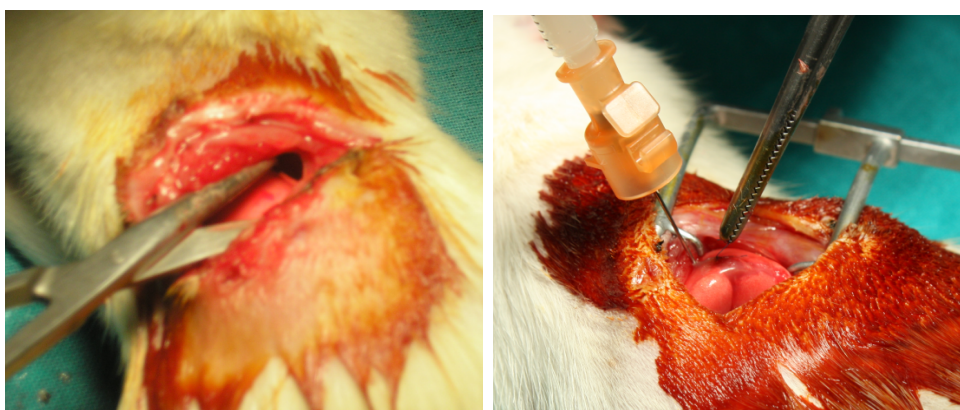
Descripción de la técnica de trasplante:

- Vía intrapulmonar (P). Para el trasplante de CMM por esta vía se procedió a la anestesia e intubación de la rata de la forma descrita en el apartado 1.1: *Modelo animal de BOS: diseño y resultados; Técnica quirúrgica*. Tras ello, se realizó una retorcotomía, exponiendo la zona de inserción del segmento traqueal señalizada con el punto de sutura irreabsorbible con el que se cerró el orificio en el parénquima. Las células fueron trasplantadas con aguja subcutánea en la zona adyacente a la localización del segmento traqueal implantado (Figura

13). La inyección de las células se realizó en 2-3 puntos alrededor de la zona diana en el parénquima. El cierre del tórax se realizó de la misma manera descrita en el apartado 1.1 *Desarrollo del modelo animal de BOS: diseño y resultados; Técnica quirúrgica*.

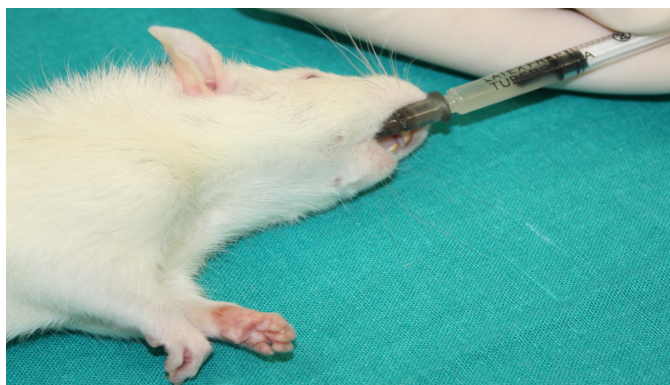
El grupo G0 no precisó retoracotomía puesto que ambos procedimientos se realizan al mismo tiempo.

Figura 13. Retoracotomía y trasplante de CMM vía P.



- Vía intratraqueal (T). Para el trasplante de CMM por esta vía se requirió anestesia e intubación de la tráquea de la rata receptora (según la técnica descrita en el apartado 1.1: Obtención del *modelo animal de BOS: diseño y resultados; Técnica quirúrgica*). La rata se colocó en decúbito lateral izquierdo, de forma que el pulmón que había recibido el implante del segmento traqueal quedase en posición declive. La jeringa que contenía las CMM suspendidas se conectó directamente al catéter de intubación orotraqueal y se instilaron lentamente (Figura 14). Tras ello, la rata se ventiló con el respirador durante varios ciclos para evitar la expulsión de las células por el tubo orotraqueal. La desconexión y extubación del animal se realizó sin incidencias.

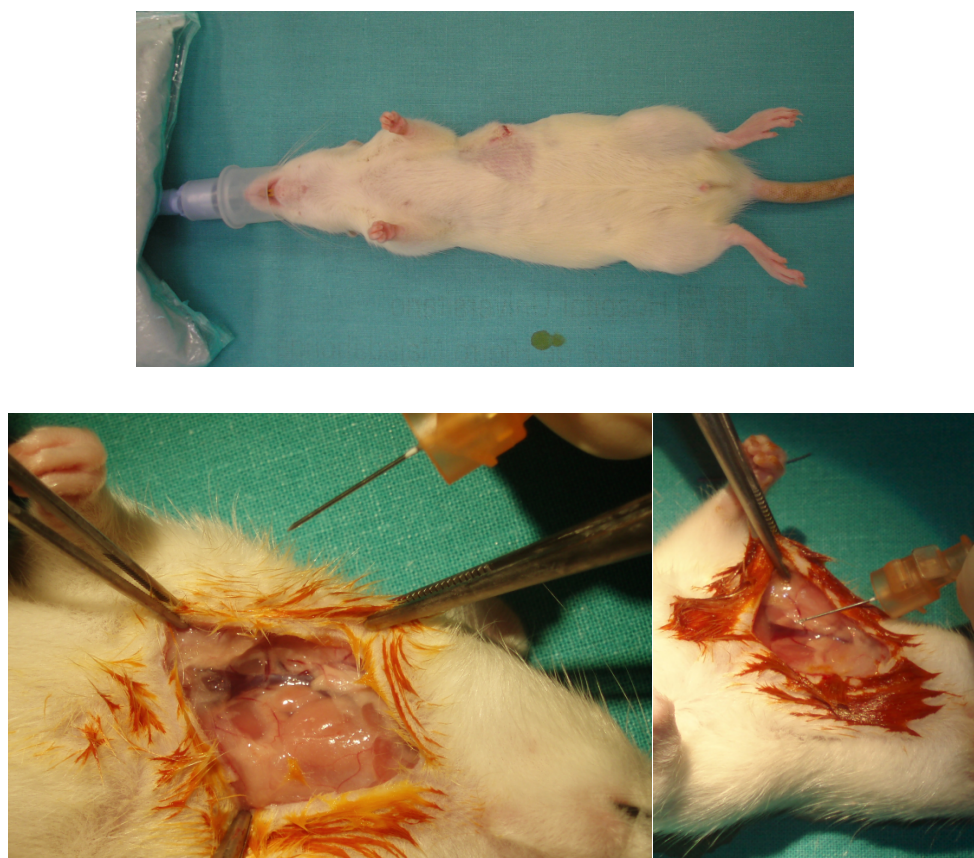
Figura 14. Trasplante de CMM vía T.



- Vía intravenosa (V). El trasplante de CMM por esta vía en el grupo G0 se realizó con la rata anestesiada e intubada (según la técnica descrita en el apartado 1.1: *Obtención del modelo animal de BOS: diseño y resultados; Técnica quirúrgica.*) debido a que todos los procedimientos se realizaron al mismo tiempo. En los grupos G7 y G14 no se precisó intubación orotraqueal sino anestesia inhalada con sevoflurano al 8%.

La rata se colocó en decúbito supino para una correcta exposición del cuello. Se realizó una incisión longitudinal al eje del cuello, ligeramente lateralizada a la derecha de la línea media. Mediante disección roma se localizó la vena yugular en el confluente con la vena subclavia a la entrada del tórax. En este punto se realizó la inyección de las CMM haciéndolas pasar lentamente para evitar trombos y extravasación de las células (Figura 15).

Figura 15. Trasplante de las CMM vía V.



#### 4.7 Eutanasia y obtención de la muestra

Para practicar la eutanasia a las ratas se les aplicó anestesia inhalada con sevoflurano al 8%, manteniéndose dicha forma de anestesia hasta la exposición del corazón. Para ello, se realiza una incisión por debajo del apéndice xifoides, accediendo a la cavidad peritoneal. Desde aquí y a través del diafragma se abre el pericardio exponiendo el corazón. La eutanasia se realiza mediante inyección intracardiaca de 5 ml de cloruro potásico (UCB Pharma, SA, Barcelona, España).

Tras comprobar la parada cardiaca se accede al pulmón izquierdo resecando el esternón y gran parte de la parrilla costal izquierda, liberando las eventuales adherencias pleuroparietales y pleuromediastínicas (Figura 16). Una vez liberado el pulmón se localiza el punto de material irreabsorbible donde se implantó el segmento

traqueal (Figura 17) y se palpa el pulmón en busca de dicho implante. Mediante disección cortante se obtiene la muestra y se conserva en formaldehído al 4% durante 24 horas (Figura 18). Posteriormente se incluyen en parafina y se realizan los cortes para el análisis histológico (2.5 a 4 micras). Serán necesarios al menos 2 cortes de una zona representativa de la muestra para tinción con hematoxilina-eosina y otros 2 para la detección de las células madre mediante hibridación in situ (descrito en apartado siguiente).

#### Otras muestras.

- De los animales que recibieron el trasplante de CMM por vía P (intraparenquimatosa) se extrajo tejido peri-implante traqueal, el cual se conservó y se procesó de idéntica forma al propio segmento traqueal extraído.
- De todos los animales se extrajo una muestra de pulmón que consistía en un corte longitudinal del pulmón izquierdo a nivel hiliar, con la intención de obtener secciones de vía aérea y vasculatura principal. Estas muestras se procesaron de igual manera a la descrita para los segmentos traqueales.



Figura 16. Eutanasia. Acceso a la cavidad pleural izquierda.

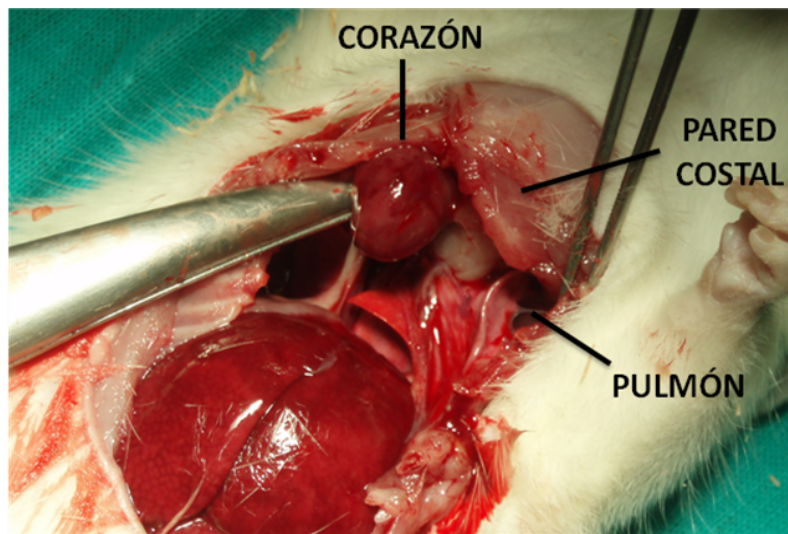


Figura 17. Pulmón izquierdo. Punto para el cierre del orificio del implante traqueal.

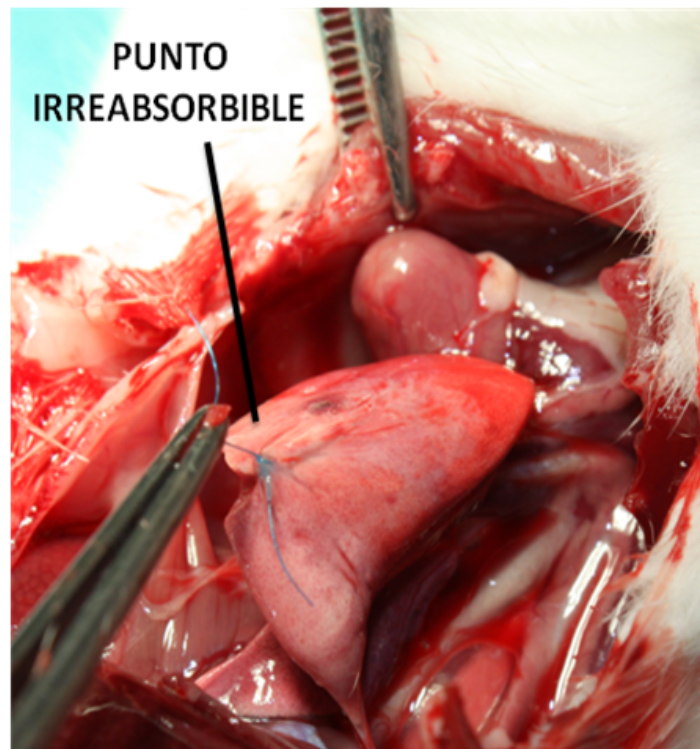
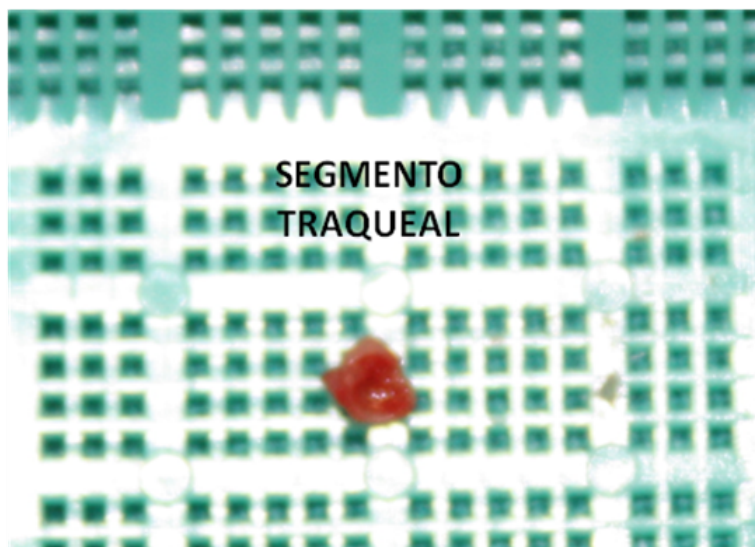




Figura 18. Segmento traqueal extraído.



#### 4.8 Detección de las CMM

Se empleó la técnica de hibridación in situ para detectar una secuencia específica del gen murino Sry, que se encuentra en el cromosoma Y en una región que codifica las proteínas encargadas de los caracteres secundarios sexuales masculinos (las células madre mesenquimales fueron obtenidas de individuos macho, mientras que todas las ratas receptoras eran hembras). Para ello se utilizó una sonda de ADN contra la región Sry del Cromosoma Y murino y que se encuentra marcada en su extremo 5' con biotina.

Se tomaron secciones en parafina de entre 3 y 4 micras procedentes del área problema, se desparafinaron y deshidrataron con xilol y una serie gradual de alcoholes llevándolos hasta el agua. Para evitar los enlaces no específicos de la sonda con grupos amino cargados positivamente por acetilación se sometieron las muestras a una incubación de tiocianato sódico a 80°C durante 10 minutos. Posteriormente, las muestras se digirieron con solución de proteinasa K (30 µg /ml) (Sigma) durante 15 minutos a 37°C con la finalidad de abrir poros en la membrana nuclear y aumentar de esta forma la accesibilidad de la sonda al ADN. La proteinasa K fue inactivada con glicina durante 2 minutos. El exceso de glicina fue eliminado mediante 3 lavados con

PBS durante 5 minutos. Después, se fijaron las muestras con paraformaldehído durante 2 minutos seguido de 3 lavados de PBS durante 5 minutos. Para evitar uniones inespecíficas se bloquearon las muestras en una solución de prehibridación (2,5 ml de formamida al 100%, 250  $\mu$ L de Denhardt's [Biochemikel Fluka], 500  $\mu$ L de SSC 20x (SSC 20X, BioRad), 20  $\mu$ L de Salmon Test 10 mgr/ml, 1,730  $\mu$ L de agua) durante 5 horas a temperatura ambiente. A continuación se realizó una incubación de la muestra a 50°C toda la noche con una mezcla de hibridación (84  $\mu$ L de solución de prehibridación, 24  $\mu$ L de Dextrán sulfato al 50% y 12  $\mu$ L de sonda (2,6  $\mu$ L por porta de 400 ng) que contenía la sonda de sADN marcada con digoxigenina.

Trascurrido el proceso de hibridación, el exceso de la sonda se eliminó mediante tres lavados con formamida al 50% durante 15 minutos a 50°C. A su vez, el exceso de formamida se limpió mediante 3 lavados de SSC 2x de 5 minutos cada uno a 50°C. Posteriormente, para favorecer la accesibilidad de los anticuerpos las muestras fueron incubadas con detergente Tween 20 (0,01 ml de Tween 20 al 10%, 20 ml de SSC 4x) (Sigma Aldrich, Madrid, España) durante 10 minutos a 50°C.

La señal de la sonda fue visualizada mediante inmunohistoquímica convencional usando un anticuerpo primario monoclonal Anti-Digoxigenina (1:100, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Baltimore Pike, USA). Transcurrido ese tiempo, las preparaciones se sometieron a tres lavados con PBS durante 15 minutos y fueron incubadas con el anticuerpo secundario Anti-mouse conjugado con biotina durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se incubó la muestra con el complejo ABC (avidina biotina conjugado con peroxidada) y posteriormente con DAB (diaminobencidina). Después, las muestras se contrastaron con Hematoxilina durante 5 minutos y se lavaron en H<sub>2</sub>O durante 10 minutos siendo deshidratadas en una serie gradual de alcohol y aclaradas con xilol antes de ser montadas con un medio de montaje. Los resultados se visualizaron usando un microscopio óptico.

La sonda biotinilada en algunos cortes fue visualizada a través de inmunofluorescencia, usando un anticuerpo primario anti-biotina mouse IgG (1:100, Jackson) y un anticuerpo secundario conjugado con Rhodamine (TRICT anti-mouse IgG [1:200, Jackson]).

Los cortes fueron incubados con diclorhidrato de 4' 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, en sus siglas en inglés [Merck]) y montados con glicerol. Se realizaron

controles negativos donde la sonda no fue añadida a la mezcla de hibridación y controles positivos donde la hibridación se realizó sobre muestras de tejido de ratas macho.

#### 4.9 Estudio inmunohistoquímico (IHQ)

En aquellas muestras en las que histología no era suficiente para caracterizar completamente el tejido, se realizó un estudio inmunohistoquímico sobre una técnica de FISH (*fluorescent in situ hybridation*, hibridación fluorescente in situ, en sus siglas en inglés) previa para detectar las CMM. El objetivo era intentar visualizar la posible co-localización del gen Sry junto con un anticuerpo primario frente a un marcador específico de neumocitos tipo II, la proteína B del surfactante pulmonar.

El surfactante pulmonar es un complejo lipo-proteico esencial para la normal función del pulmón, siendo responsable de mantener la tensión superficial en la interfase aire-líquido de la superficie alveolar, lo que hace que dichos alveolos no se colapsen al final de la expiración. Existen 4 subtipos de proteínas que forman parte del surfactante: proteína A (SP-A), proteína B (SP-B), proteína C (SP-C) y proteína D (SP-D). La B es una proteína de bajo peso molecular que está en íntimo contacto con la película lipídica de la interfase aire-líquido. Se le atribuyen varias funciones: 1) absorción de los lípidos, esto es, anclaje reversible de los mismos en la interfase; 2) reclutamiento de dichos lípidos hacia la superficie desde el reservorio situado en la hipofase, más cercana a la membrana celular del neumocito tipo II. En resumen, su función es básicamente regular la estructura, integridad y composición de la película de lípidos superficial, que contribuye a mantener la tensión en la superficie alveolar.

Una vez finalizada la hibridación in situ se incubaron las muestras con un anticuerpo primario monoclonal contra surfactante pulmonar maduro B mouse IgG (1:500, ab40876 Abcam [Cambridge-UK]) toda la noche a 4°C. Tras lavar las muestras se incubaron nuevamente durante una hora con un anticuerpo secundario conjugado con CyTM 2 anti-mouse IgG (1:200, Jackson). Los cortes fueron incubados con DAPI

(Invitrogen) como marcador para identificar los núcleos celulares y fueron montados con glicerol. Se realizaron controles negativos y positivos.

#### 4.10 Variables

- Macroscópicas:
  - Presencia de adherencias pleurales: pulmón libre, adherencias laxas focales, laxas difusas, intensas focales e intensas difusas.
    - \*Adherencias laxas: adhesiolisis con disección roma.
    - \*Adherencias intensas: adhesiolisis con disección cortante.
    - \*Adherencias focales: localizadas en una zona concreta de la cavidad pleural.
    - \*Adherencias difusas: localizadas por toda la cavidad.
  - Presencia de signos de infección pleural: abscesos y/o secreciones purulentas.
  - Restos de solución de plasma con CMM (en las ratas con trasplante de CMM vía P).
- Microscópicas:
  - a) Injerto traqueal:
    - Obliteración de la luz traqueal: 0 (no), 1 (parcial) o 2 (total). Se añade además un análisis cuantitativo detallado de los grados de obliteración: Grado 0=no obliteración; grado 1=0-25%; grado 2=25-50%; grado 3=50-75%; grado 4=75-100%.
    - Fibrosis: grados 0 (nula/leve), 1 (laxa) y 2 (densa).
    - Inflamación: grados 0 (nula o leve, células inflamatorias aisladas), 1 (moderada, células inflamatorias en acúmulos focales) y 2 (severa, infiltrado inflamatorio difuso).
    - Presencia de neovascularización: grado 0 (nula/pocos vasos de calibre visible y endotelio), grado 1 (presencia moderada de vasos de calibre

visible y endotelio) y grado 2 (presencia importante de vasos de calibre visible y endotelio).

- Patrón histológico (ver Figura 6, donde se detalla el modelo animal de BOS): patrones del 0 al 4.

- Edema: grados 0 (nulo/leve), 1 (parcheado) y 2 (difuso).

b) Parénquima peri-injerto traqueal: inflamación aguda leve, moderada o grave (presencia de células polimorfonucleares aisladas, en acúmulos focales o en forma de infiltrado difuso, respectivamente); inflamación crónica leve, moderada o grave (presencia de células mononucleares aisladas, en acúmulos focales o en forma de infiltrado difuso, respectivamente).

- Detección y localización de las CMM: luz traqueal, epitelio, submucosa, muscular, cartílago y/o parénquima pulmonar peri-injerto.

#### 4.11 Estadística

Se trata de un estudio prospectivo y aleatorizado. El anatómo-patólogo desconocía la vía de administración de las células madre y el tiempo en el que fueron trasplantadas.

Se informaron los resultados mediante la media, desviación típica y valores extremos de los valores originales.

Las tablas contienen los valores absolutos y porcentajes en la respuesta del patrón y la obliteración, teniendo en cuenta el grupo y la vía de administración. Las diferencias del patrón entre tiempos y vía de administración se establecieron con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. El análisis del resto de los datos cualitativos en tablas 2x2 se analizaron mediante la prueba Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) corregida por continuidad y el test exacto de Fisher. Para todas las pruebas se aceptó un valor de significación inferior a 0,05 en contraste bilateral.

El análisis de los datos fue realizado por el Servicio de Bioestadística del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda mediante el programa estadístico SPSS v14.0.



## *RESULTADOS*





## 5 RESULTADOS

Se realizaron 45 implantes de segmentos traqueales según la técnica descrita en Material y Métodos. Además, se añadieron 2 individuos para completar el grupo control hasta 5 individuos (Anexo Tabla 4).

Se produjeron 2 pérdidas durante la aplicación de CMM por vía V (vascular). Un tercer individuo al que se le aplicaron CMM también por vía V falleció al tercer día postoperatorio.

Anexo Tabla 4. Resultados del modelo animal de BOS tomado como referencia para el estudio (5 individuos).

INDIVIDUO	OBLITERACIÓN	HISTOLOGÍA	PATRÓN	GRANULOMAS CUERPO EXT.
LW 21.1	4	FD	4	NO
LW 21.2	4	FD	4	SÍ
LW 21.3	4	FL→FD	3	SÍ
LW 21.4	4	FD	4	NO
LW 21.5	4	FL	3	NO

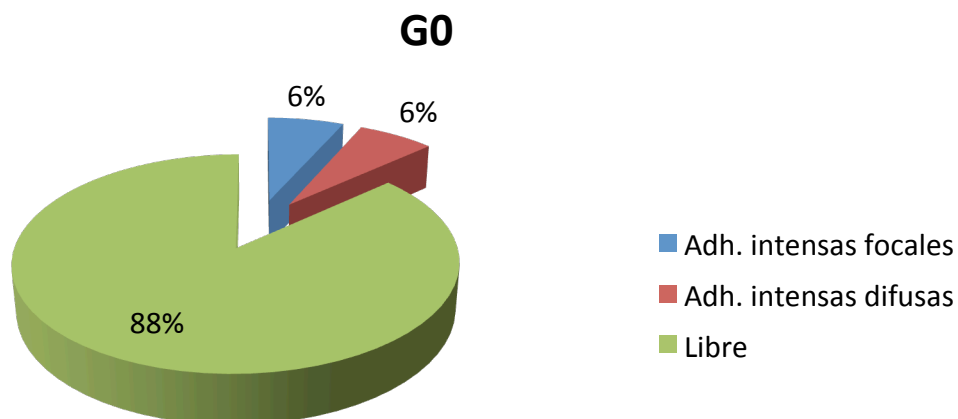
### 5.1 Estudio macroscópico

En cuanto a la presencia de adherencias en el hemitórax intervenido se encontraron los siguientes resultados en los diferentes grupos (Figuras 19-21) [Tabla 5]:

- Grupo G0:

En este grupo se evidenció un caso (6%) de adherencias intensas focales entre la zona del pulmón donde estaba situado el punto de sutura irreabsorbible que cierra el orificio de inserción del segmento traqueal y la propia toracotomía. En otro de los casos (6%) se objetivaron adherencias intensas difusas por toda la cavidad pleural. En ambos casos, la aplicación de las células madre se realizó vía intrapulmonar (P). El resto de los sujetos (88%) presentó un pulmón libre de adherencias (p 0.01).

No se detectaron diferencias significativas al comparar con el grupo control.

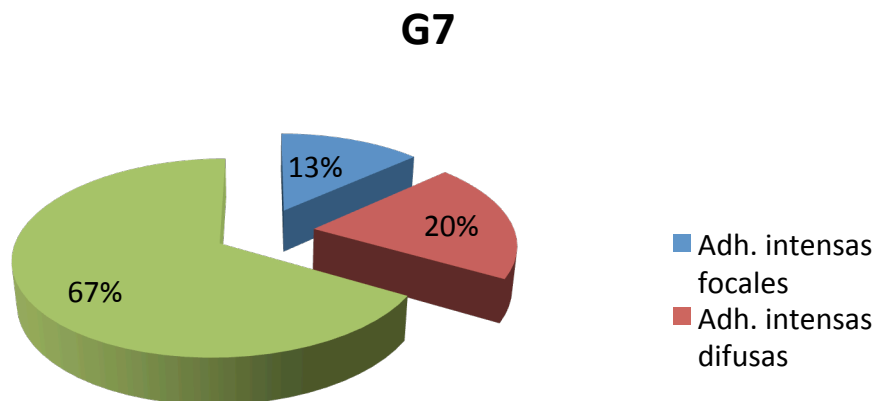


- Grupo G7:

En este grupo se observaron adherencias intensas focales localizadas en la zona de la toracotomía en 2 casos (13%). Uno de los casos había recibido las células madre por vía intratraqueal (T) y el otro por vía P. En 3 casos (20%) se encontraron

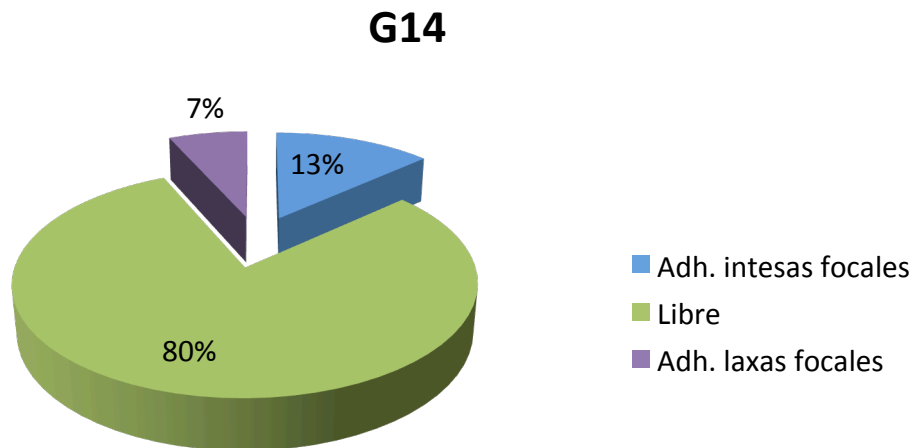
adherencias intensas difusas, habiendo recibido las células madre por vía P (p 0.02). En los 10 individuos restantes (67%), el pulmón estaba libre de adherencias (p 0.01).

Si comparamos con el grupo control, solo se detectaron diferencias significativas (p 0.028) al considerar los individuos del subgrupo que habían recibido las CMM por vía intrapulmonar (G7\_P) [Tabla 5].



- G14:

Se objetivaron adherencias pleurales intensas focales en 2 casos (13%) que estaban localizadas en la zona de la toracotomía. Uno de los casos había recibido las células madre por vía T y el otro por vía P. Se encontraron adherencias laxas focales en un caso (6%) que recibió las células por vía V. El resto de los individuos (80%) no presentaron adherencias (p 0.01). No se observaron diferencias significativas al comparar con el grupo control.



Tanto en el grupo G7 como el G14, los individuos fueron sometidos a una retoracotomía para trasplantar las células por vía intrapulmonar (P). El G0 recibió el injerto traqueal y las CMM en la misma cirugía.

La cavidad pleural estaba libre de signos de infección (secreciones purulentas o abscesos) en todos los casos.

En los casos de trasplante de células madre por vía P, no se objetivaron restos de la solución con la suspensión de células ni en la cavidad pleural ni en el parénquima pulmonar.

Tabla 5. Adherencias

<b>Grupo</b>	<b>Libre de Adherencias</b>	<b>Adherencias laxas difusas</b>	<b>Adherencias laxas focales</b>	<b>Adherencias intensas focales</b>	<b>Adherencias intensas difusas</b>
<b>G0_P</b>	3	-	-	1	1
<b>G0_V</b>	5	-	-	-	-
<b>G0_T</b>	5	-	-	-	-
<b>G7_P</b>	1	-	-	1	3
<b>G7_V</b>	5	-	-	-	-
<b>G7_T</b>	4	-	-	1	-
<b>G14_P</b>	4	-	-	1	-
<b>G14_V</b>	4	-	1	-	-
<b>G14_T</b>	4	-	-	1	-
<b>CONTROL</b>	5	-	-	-	-

Figura 19. Pulmón sin adherencias.

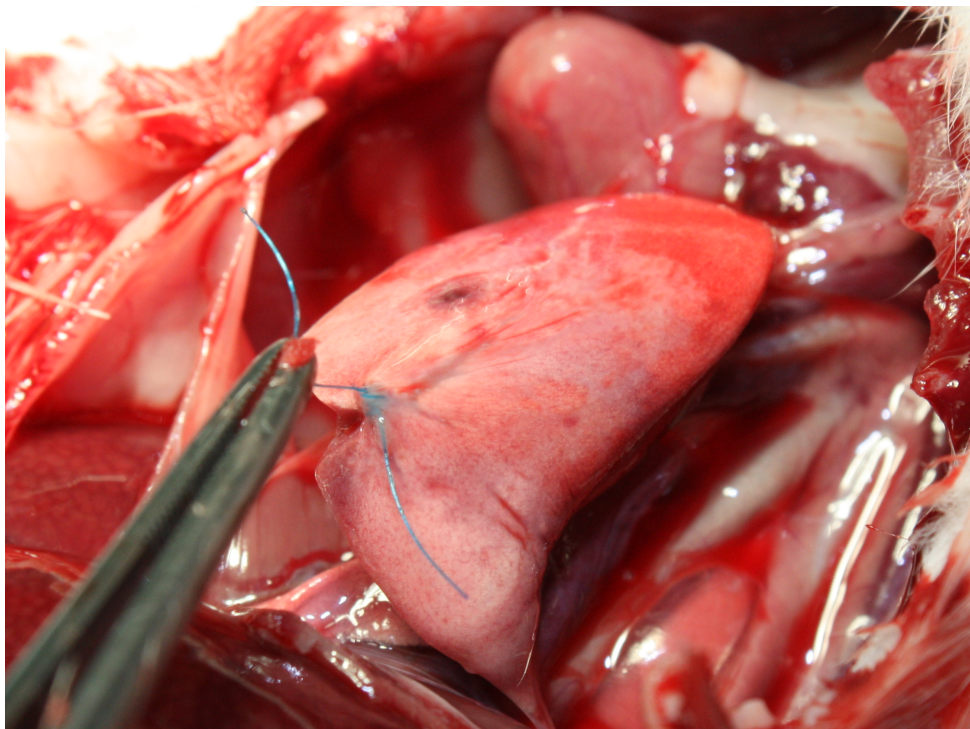


Figura 20. Adherencias intensas focales.

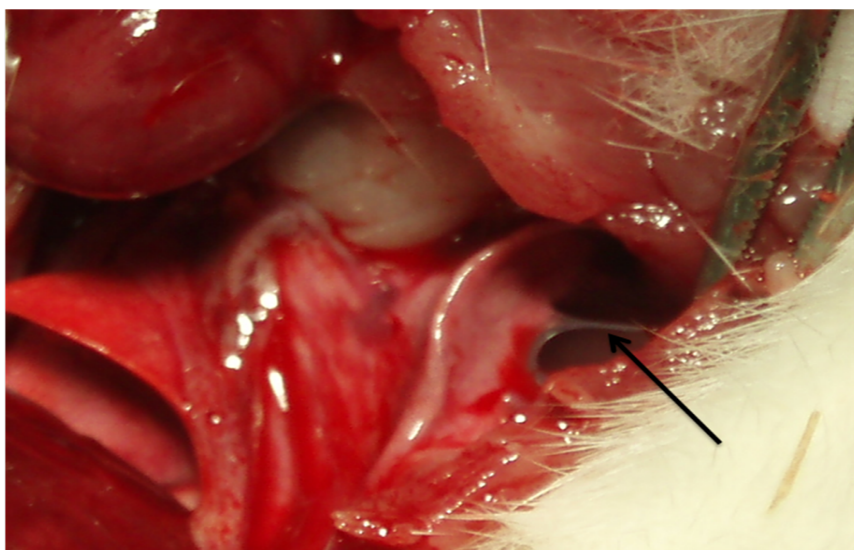
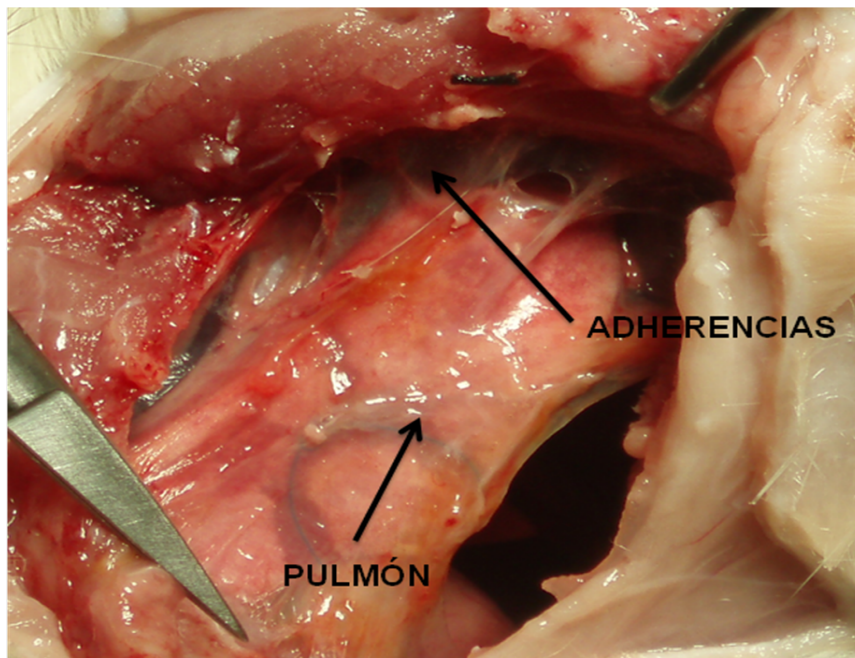


Figura 21. Adherencias intensas difusas.





## 5.2 Estudio microscópico

### a) Injerto traqueal

- Grupo G0

- Obliteración (Figuras 22, 23): en este grupo, 12 individuos presentaron un grado de obliteración 4 (100% de la luz traqueal) y 2 presentaron un grado 3 (75 a 100%). El individuo restante mostró un grado 1 (de 0 a 25% de la luz traqueal obliterada). Si comparamos con el grupo control, en el que todos los individuos presentaron un grado 4, no se encuentran diferencias [Tabla 6]. Tampoco se encuentran diferencias al comparar las diferentes vías de administración de las CMM con el grupo control, ni al comparar las 3 vías entre sí [Tabla 9].

Figura 22. Injerto no obliterado.

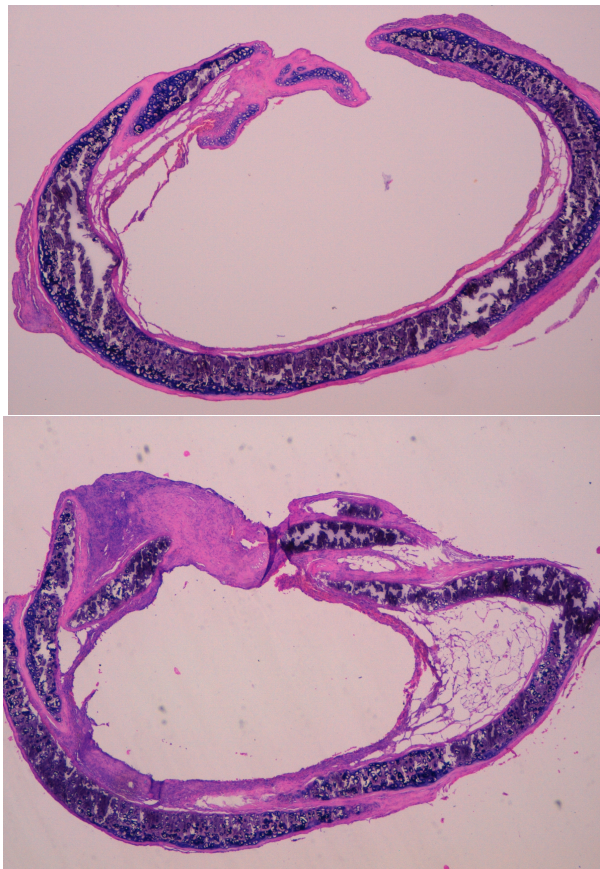
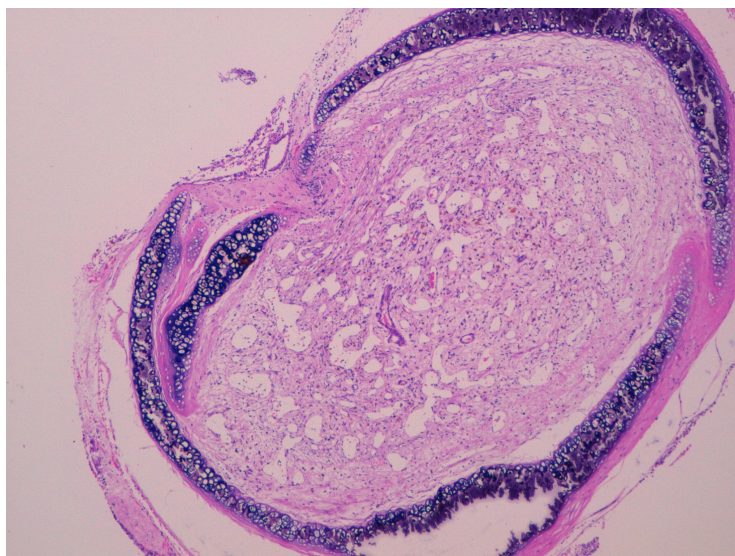


Figura 23. Injerto obliterado.



- Patrón histológico:

Los patrones histológicos, como se especifica en Material y Métodos, son los definidos en el modelo animal de BOS desarrollado previamente (Figura 6, apartado 1.1, Material y Métodos) y están numerados del 0 al 4, donde 0 representa ausencia de respuesta histológica y 4 se refiere a fibrosis densa.

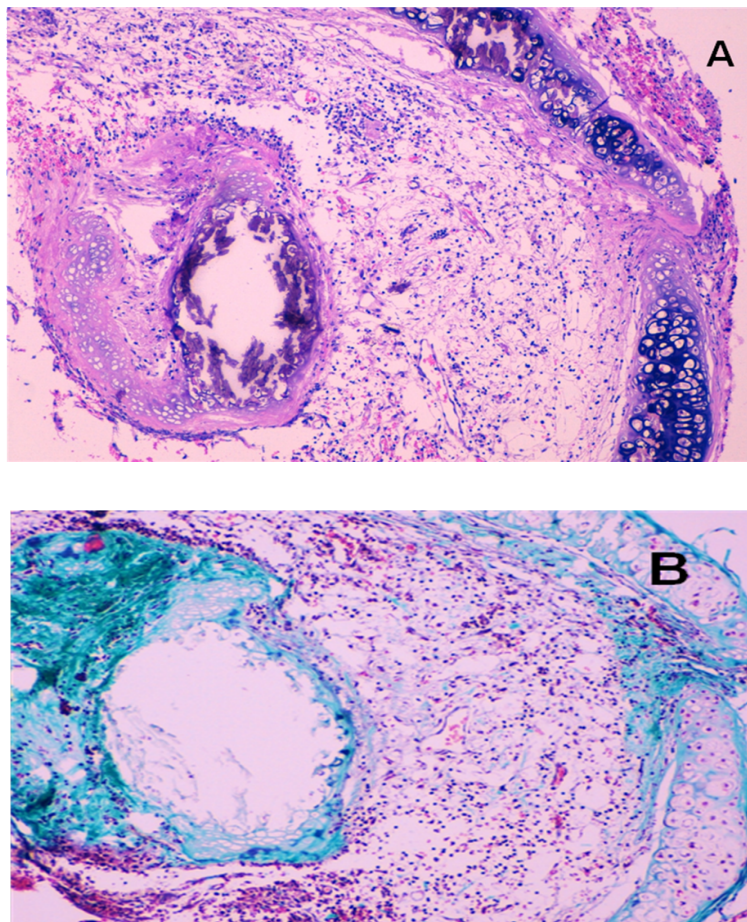
Por otro lado, en el análisis histológico se objetivó un **nuevo patrón** (que llamaremos patrón 2+3) [Figura 24] no definido previamente puesto que no aparecía representado en la secuencia temporal con la que se determinó el modelo (ver Consideraciones Iniciales. Material y Métodos). Este nuevo patrón 2-3 se caracteriza por presentar una gran cantidad de neovasos en un lecho de tejido fibroso muy laxo. Por ello, se parece al patrón 2 (tejido de granulación con neovascularización + inflamación con celularidad mixta) en los neovasos que se observan, pero difiere de él en que éstos son más numerosos y de mayor calibre, y no asocia infiltrado inflamatorio. También tiene similitudes con el patrón 3 (tejido fibroso laxo sin inflamación y sin apenas vasos) puesto que aparece un tejido fibroso muy laxo en la luz traqueal. Sin embargo, la fibrosis es mucho menos marcada (la tinción con tricrómico pone de manifiesto menor cantidad de fibras colágenas) y, de nuevo, los

neovasos son más abundantes y de mayor calibre. Por lo tanto, no se trata de un patrón intermedio entre 2 y 3, sino un nuevo patrón con algunas características del patrón 2 y otras del patrón 3.

Dicho patrón está incluido en el estudio estadístico que se especifica a continuación.

Como se detalla en la tabla 5, 13 individuos de este grupo presentaron el descrito patrón 2+3. Los otros 2 individuos presentaron un patrón 2, mientras que todos los casos del grupo control presentaron patrón 3 ó 4. Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas ( $p < 0.006$ ). Las diferencias se mantuvieron al analizar cada vía de administración de CMM frente al grupo control ( $p < 0.006$ ) [Tabla 10].

Figura 24. Patrón 2+3. A: Hematoxilina/Eosina. B: Tinción tricrómica; se aprecia el colágeno en verde.



- Fibrosis [Tablas 5 y 11]: 14 individuos (93,3%) presentaron un grado 1 ó 2 de fibrosis (1-laxa; 2-densa), mientras que en el grupo control los 5 individuos presentaron un grado 2. No se detectaron diferencias entre ambos grupos, al igual que tampoco se encontraron diferencias al comparar las 3 vías de administración con el grupo control.

- Inflamación: independientemente de la vía de administración, en todas las muestras se encontraron signos de inflamación. El grado que se detectó en el injerto traqueal fue leve en 13 individuos (86,7%) y grave en 2 (13,3%) [Tabla 6], mientras que entre los individuos del grupo control no se objetivó ningún caso de inflamación [Tabla 12] ( $p < 0.001$ ).

- Neovascularización: todos los individuos de los grupos G0 presentaron algún grado de neovascularización (5 de ellos un grado 1 -leve-, y 10 presentaron un grado 2 -severo-). Por su parte, en el grupo control se observaron 2 individuos sin evidencia de neovascularización, y en los 3 que se objetivó fue de grado 1 [Tabla 6]. Por tanto, las diferencias entre los casos de este grupo G0 y el grupo control no fueron significativas.

Al analizar las 3 vías de administración de manera independiente y compararlas con el grupo control, tampoco se encontraron diferencias significativas [Tabla 13].

- Edema: [Tabla 6] agrupando los individuos de cada grupo que presentaron un grado 1 ó 2, obtenemos que la distribución de la aparición de edema es homogénea, 7 individuos sin edema y 8 con grados 1 ó 2. Si los comparamos con el grupo control (en el que no se observó edema en ningún caso) se detectan diferencias estadísticamente significativas ( $p 0.023$ ).

Al considerar las 3 vías de administración y compararlas con el grupo control, solo se encuentran diferencias significativas en los individuos en los que se administraron las CMM por vía intrapulmonar (P) [ $p 0.048$ ] [Tabla 14].

Tabla 6. Resultados del grupo G0.

<b>VARIABLE</b>		<b>G0</b>	<b>CONTROL</b>	<b>p</b>
Obliteración	0 1 2 3 4	1 (6,6%)  2 (13,3%) 12 (80%)	5 (100%)	0.53
Patrón	0, 1, 2 2+3 3, 4	2 (13,4%) 13 (86,6%) 0	0 5 (100%)	0.006
Fibrosis	No Sí (grado 1 y 2)	1 (6,7%) 14 (93,3%)	0 5 (100%)	0.53
Inflamación	No Sí (grado 1 y 2)	0 15 (100%)	5 (100%) 0	<0.001
Neovascularización	No Sí (grado 1 y 2)	0 15 (100%)	2 (40%) 3 (60%)	0.053
Edema	No Sí (grado 1 y 2)	7 (46,7%) 8 (53,4%)	5 (100%) 0	0.023

- Grupo G7:

- Obliteración: 7 individuos (46,7%) presentaron un grado 3 ó 4 de obliteración, mientras que en 8 de ellos (53,3%) se observó un grado 1, por lo que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar con el grupo control (p 0.054) [Tabla 7]. Si tenemos en cuenta las diferentes vías de administración de las CMM, en concreto el subgrupo que las recibió por vía traqueal (G7\_T), observamos que en 4 casos se detectó un grado 1 de obliteración. Comparando con el grupo control se obtuvieron diferencias significativas (p 0.048) [Tabla 9].

- Patrón histológico [Tabla 7]: al igual que en el grupo G0, todos los individuos del G7 presentan un patrón diferente del 3 y del 4, mientras que todos los casos del grupo control presentan un patrón 3 ó 4 (p 0.006). También encontramos diferencias significativas si comparamos cada una de las vías de administración de CMM (G7\_V, G7\_T y G7\_P) con los casos control (p 0.008) [Tabla 10].

- Fibrosis [Tabla 7]: en este grupo, 10 individuos (66,6%) no presentaron fibrosis, en 3 (20%) se observa un grado 1 y en 2 casos (13,3%) un grado 2. Si lo comparamos con el grupo control, en el que todos los individuos presentan un grado 1 ó 2 de fibrosis, se obtienen diferencias significativas (p 0.033). Al considerar la vía de administración de las CMM, tan sólo encontramos diferencias estadísticamente significativas en aquellos individuos que las recibieron por vía traqueal (G7\_T) (p 0.008) [Tabla 11].

- Inflamación [Tabla 7]: en 9 individuos (60%) no se presentó ningún signo de inflamación. Sin embargo, se observó inflamación grado 1 en 4 casos (26,7%) y grado 2 en 2 casos (13,3%). Si comparamos con el grupo control, en el que ningún individuo tiene inflamación, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Al considerar las vías de administración, la mayor diferencia con el grupo control se observó en el subgrupo que recibe las células por vía intraparenquimatosa (G7\_P) (p 0.048).

- Neovascularización [Tabla 6]: en 7 individuos (46,7%) no se observó neovascularización, en 1 caso (6,7%) se detectó un grado 1 y en otros 7 (46,7%) un

grado 2. En cuanto a los individuos del grupo control, 2 no presentaron neovascularización y 3 presentaron un grado 1. No se detectaron diferencias significativas en este caso ni tampoco al comparar los subgrupos por vía de administración con el grupo control [Tabla 13].

- Edema [Tabla 6]: en 7 individuos de este grupo (46,7%) no se observó edema en la muestra, mientras que en 8 casos (53,4%) se apreció edema grado 1 ó 2. Al comparar los resultados con el grupo control, en el que ningún individuo presentó edema, se observaron diferencias significativas ( $p$  0.028). Teniendo en cuenta las vías de administración de CMM, solamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el subgrupo que recibió las células por vía vascular (G7\_V) y el grupo control ( $p$  0.048) [Tabla 14].



Tabla 7. Resultados del grupo G7.

<b>VARIABLE</b>		<b>G7</b>	<b>CONTROL</b>	<b>p</b>
Obliteración	0 1 2 3 4	8 (53,3%)  4 (26,7%) 3 (20%)	5 (100%)	0.054
Patrón	0, 1, 2, 2+3 3, 4	7 (47,6%) 8 (53,4%) 0	0 5 (100%)	0.006
Fibrosis	No Sí (grado 1 y 2)	10 (66,6%) 5 (33,4%)	0 5 (100%)	0.033
Inflamación	No Sí (grado 1 y 2)	9 (60%) 6 (40%)	5 (100%) 0	0.260
Neovascularización	No Sí (grado 1 y 2)	7 (47,6%) 8 (53,4%)	2 (40%) 3 (60%)	0.12
Edema	No Sí (grado 1 y 2)	7 (47,6%) 8 (53,4%)	5 (100%) 0	0.028



- Grupo G14:

- Obliteración [Tabla 8]: en 2 individuos (13,4%) se apreció un grado 1 de obliteración, mientras que en 13 casos (86,6%) se objetivó una obliteración de grado 3 ó 4. Comparado con el grupo control (los 5 individuos presentan obliteración) no se observaron diferencias.

Tampoco se observaron diferencias al analizar por subgrupos dependiendo de la vía de administración de las CMM [Tabla 9].

- Patrón histológico [Tabla 8]: en 2 individuos (13,4%) se objetivó un patrón 0, mientras que en 9 casos (60%) se observó un patrón 2+3. Los 4 restantes presenta un patrón claro de fibrosis laxa (patrón 3). En cuanto a esta variable, y al comparar con el grupo control en el que todos los individuos tienen un patrón 3 ó 4, las diferencias que se detectaron fueron estadísticamente significativas (p 0.011).

Por otro lado, al establecer comparaciones entre los subgrupos resultantes de las diferentes vías de administración de las CMM y el grupo control, se encuentran diferencias significativas entre el G14\_T y el G14\_V (p 0.048 y 0.028, respectivamente), puesto que todos los individuos de estos subgrupos excepto uno presentaron un patrón histológico distinto del 3 y 4 [Tabla 10]).

- Fibrosis [Tabla 8]: en cuanto a la fibrosis, 9 individuos (60%) de este grupo presentaron un grado 1 (fibrosis laxa) y en 6 casos (40%) se observó un grado 2 (fibrosis densa). No se detectaron diferencias cuando se comparó con el grupo control, en el que también el 100% de los casos presentaron un grado 1 ó 2 de fibrosis. Tampoco se detectaron diferencias al comparar las vías de administración de CMM frente al grupo control [Tabla 11].

- Inflamación [Tabla 8]: se observó un grado 1 ó 2 en 14 individuos de este grupo (93,4%) y en tan solo un caso no hubo signos de infiltrado inflamatorio (vía P). En los controles no se observó infiltrado inflamatorio en ningún caso por lo que se detectaron diferencias significativas en la comparación (p <0.001) y éstas se mantuvieron al comparar las tres vías de administración con el grupo control (p 0.048 para el subgrupo G14\_P, y p 0.028 para el G14\_T y G14\_V) [Tabla 12].

- Neovascularización [Tabla 8]: En 9 casos (60%) se objetivó un grado 1 (presencia moderada de vasos de calibre visible y endotelio), y en 6 casos (40%) un grado 2 (presencia importante de dichos vasos). En tan solo 1 caso no se observaron neovasos en la muestra. En cuanto al grupo control, 3 casos presentan un grado 1 ó 2 de neovascularización. No se detectaron diferencias significativas.

Tampoco se encontraron diferencias significativas cuando comparamos las 3 vías de administración de CMM frente a los casos del grupo control [Tabla 13].

- Edema [Tabla 8]: si analizamos el edema en las muestras, observamos que 4 casos (26,6%) no presentaban edema, mientras que en 10 (73,4%) se observó un grado 1 ó 2. En el grupo control no se evidenció edema en ninguno de los casos, por lo que las diferencias que se detectaron con este grupo G14 fueron significativas ( $p = 0.048$ ).

Sin embargo, al comparar las 3 vías de administración de CMM de manera independiente frente a los casos del grupo control, sólo se detectaron diferencias significativas en el subgrupo de administración por vía traqueal (G14\_T) ( $p = 0.028$ ) [Tabla 14].

Tabla 8. Resultados del grupo G14.

<b>VARIABLE</b>		<b>G14</b>	<b>CONTROL</b>	<b>p</b>
Obliteración	0 1 2 3 4	2 (13,4%)  6 (40%) 7 (46,6%)	5 (100%)	0.48
Patrón	0, 1, 2, 2+3 3, 4	2 (13,4%) 9 (60%) 4 (26,6%)	0  5 (100%)	0.011
Fibrosis	No Sí (grado 1 y 2)	0 15 (100%)	0 5 (100%)	0.5
Inflamación	No Sí (grado 1 y 2)	1 (7,1%) 14 (93,4%)	5 (100%) 0	0.001
Neovascularización	No Sí (grado 1 y 2)	0 15 (100%)	2 (40%) 3 (60%)	0.058
Edema	No Sí (grado 1 y 2)	4 (26,6%) 11 (73,4%)	5 (100%) 0	0.048

Tabla 9. Resultados en cuanto a la **obliteración** por subgrupos, teniendo en cuenta las 3 vías de administración de CMM.

	Combinación GRUPO TEMPORAL y VIA DE ADMINISTRACIÓN DE CMM									
OBLIT.	G0_P	G0_V	G0_T	G7_P	G7_V	G7_T	G14_P	G14_V	G14_T	CONTROL
Grados 0, 1	0	0	1 (20%)	1 (20%)	3 (60%)	4 (80%)	1 (20%)	0	1 (20%)	0
Grados 2-4	5 (100%)	5 (100%)	4 (80%)	4 (80%)	2 (40%)	1 (20%)	4 (80%)	5 (100%)	4 (80%)	5 (100%)

Tabla 10. Resultados en cuanto al **patrón histológico** por subgrupos, teniendo en cuenta las 3 vías de administración de CMM.

	Combinación GRUPO TEMPORAL y VIA DE ADMINISTRACIÓN DE CMM									
PATRÓN	G0_P	G0_V	G0_T	G7_P	G7_V	G7_T	G14_P	G14_V	G14_T	CONTROL
0, 1, 2, 2+3	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	1 (20%)	5 (100%)	4 (80%)	0
3, 4	0	0	0	0	0	0	4 (80%)	0	1 (20%)	5 (100%)

Tabla 11. Resultados en cuanto a la **fibrosis** por subgrupos, teniendo en cuenta las 3 vías de administración de CMM.

	Combinación GRUPO TEMPORAL y VIA DE ADMINISTRACIÓN DE CMM									
FIBROSIS	G0_P	G0_V	G0_T	G7_P	G7_V	G7_T	G14_P	G14_V	G14_T	CONTROL
No (0)	1 (20%)	0	0	2 (40%)	3 (60%)	5 (100%)	0	0	0	0
Sí (1, 2)	4 (80%)	5 (100%)	5 (100%)	3 (60%)	2 (40%)	0	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)

Tabla 12. Resultados en cuanto a la **inflamación** por subgrupos, teniendo en cuenta las 3 vías de administración de CMM.

	Combinación GRUPO TEMPORAL y VIA DE ADMINISTRACIÓN DE CMM									
INFLAM.	G0_P	G0_V	G0_T	G7_P	G7_V	G7_T	G14_P	G14_V	G14_T	CONTROL
No (0)	0	0	0	1 (20%)	3 (60%)	5 (100%)	1 (20%)	0	0	5 (100%)
Sí (1, 2)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	4 (80%)	2 (40%)	0	4 (80%)	5 (100%)	5 (100%)	0

Tabla 13. Resultados en cuanto a la **neovascularización** por subgrupos, teniendo en cuenta las 3 vías de administración de CMM.

	Combinación GRUPO TEMPORAL y VIA DE ADMINISTRACIÓN DE CMM									
NEOVAS.	G0_P	G0_V	G0_T	G7_P	G7_V	G7_T	G14_P	G14_V	G14_T	CONTROL
No (0)	0	0	0	1 (20%)	3 (60%)	3 (60%)	1 (20%)	0	0	2 (40%)
Sí (1, 2)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	4 (80%)	2 (40%)	2 (40%)	4 (80%)	5 (100%)	5 (100%)	3 (60%)

Tabla 14. Resultados en cuanto al **edema** por subgrupos, teniendo en cuenta las 3 vías de administración de CMM.

	Combinación GRUPO TEMPORAL y VIA DE ADMINISTRACIÓN DE CMM									
EDEMA	G0_P	G0_V	G0_T	G7_P	G7_V	G7_T	G14_P	G14_V	G14_T	CONTROL
No (0)	1 (20%)	3 (60%)	3 (60%)	4 (80%)	1 (20%)	2 (40%)	2 (40%)	2 (40%)	0	5 (100%)
Sí (1, 2)	4 (80%)	2 (40%)	2 (40%)	1 (20%)	4 (80%)	3 (60%)	3 (60%)	3 (60%)	5 (100%)	0

Leyenda de las tablas 9 a 14.

CMM: Células Madre Mesenquimales

G0\_P: Las CMM se trasplantan por **vía intrapulmonar** el mismo día que se implanta el segmento traqueal.

G0\_V: Las CMM se trasplantan por **vía intravascular** el mismo día que se implanta el segmento traqueal.

G0\_T: Las CMM se trasplantan por **vía intratraqueal** el mismo día que se implanta el segmento traqueal.

G7\_P: Las CMM se trasplantan por **vía intrapulmonar** a los 7 días del implante del segmento traqueal.

G7\_V: Las CMM se trasplantan por **vía intravascular** a los 7 días del implante del segmento traqueal.

G7\_T: Las CMM se trasplantan por **vía intratraqueal** a los 7 días del implante del segmento traqueal.

G14\_P: Las CMM se trasplantan por **vía intrapulmonar** a los 14 días del implante del segmento traqueal.

G14\_V: Las CMM se trasplantan por **vía intravascular** a los 14 días del implante del segmento traqueal.

G14\_T: Las CMM se trasplantan por **vía intratraqueal** a los 14 días del implante del segmento traqueal.

b) Parénquima alrededor del injerto traqueal

En el parénquima adyacente se apreció un infiltrado inflamatorio crónico leve peribronquial compuesto fundamentalmente por linfocitos. Dicho infiltrado se detectó en la práctica totalidad de las muestras.

### 5.3 Análisis histopatológico

En el análisis histológico se observó la ocupación de la luz traqueal por un tejido indeterminado que en algunas muestras recordaba a tejido alveolar. En otras, sin embargo, este tejido se componía de abundantes neovasos de gran calibre; y existe un tercer grupo en el que, si bien en el primer corte del bloque de parafina se identificaba este tejido pulmonar, en los cortes sucesivos aparecieron neovasos. Este tejido estaba en contigüidad y/o a continuación de muchos de los cortes donde se observó el llamado *patrón 2+3*. En las figuras 25 y 26 se puede observar estas expresiones histológicas.

Este tejido se detectó con las frecuencias que se describen en la tabla 15. En ningún caso se detectaron diferencias significativas. En ningún individuo de los controles se observó tejido de estas características.

Tabla 15. Presencia del tejido pulmonar en los diferentes grupos temporales.

TEJIDO ALVEOLAR	G0	G7	G14
NO	7 (46,6%)	8 (53,3%)	9 (60%)
SI	8 (53,4%)	7 (46,7%)	6 (40%)



Figura 25. Fotografía del individuo G14\_T\_1.

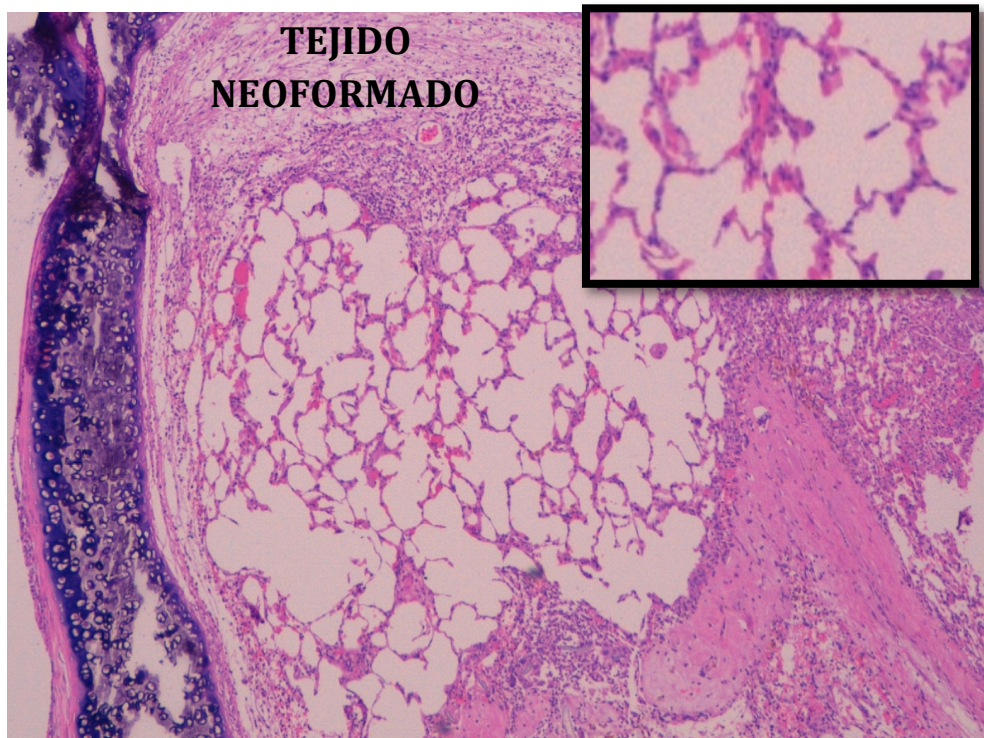
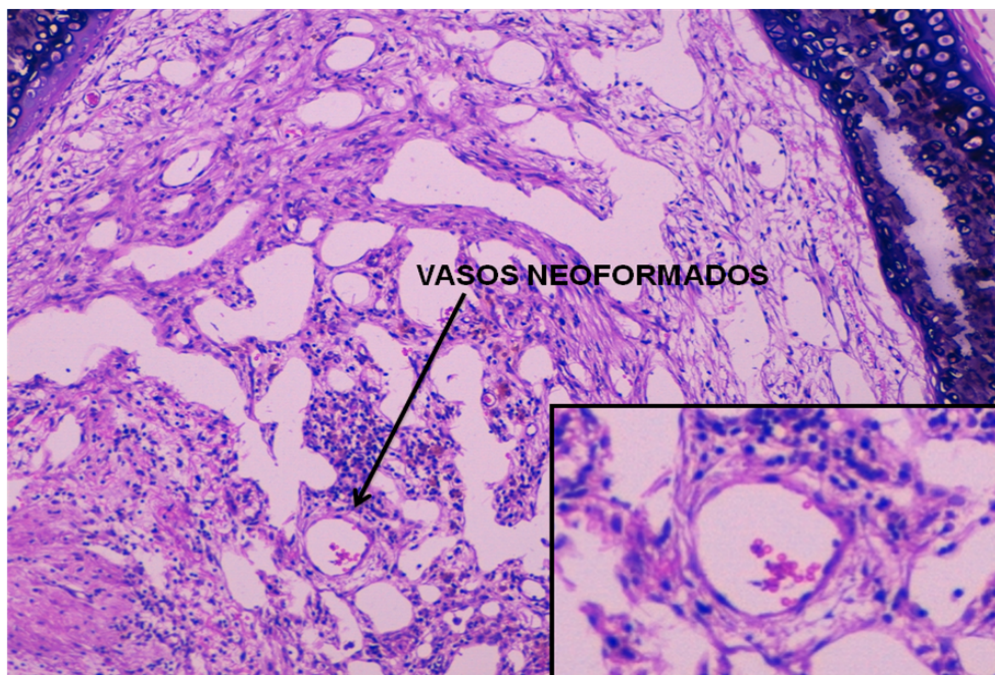


Figura 26. Fotografía del individuo G0\_8\_T.



Para caracterizar este tejido desde el punto de vista histológico se realizó sobre las muestras una técnica de **inmunohistoquímica** (usando anticuerpos frente a un marcador específico de neumocitos tipo II, la proteína B del surfactante pulmonar) tras una FISH para detectar las CMM.

#### Muestras y resultados.

Los resultados obtenidos se resumen en las tablas 29, 30 y 31.

En el grupo G0, 8 individuos presentaban este tejido en la luz del segmento traqueal. En 6 de ellos se encontraron CMM con IHQ para la proteína B del surfactante pulmonar positiva, y en 2 no se hallaron CMM.

En cuanto al grupo G7, de los 7 casos en los que se observa el tejido, en 5 se objetivaron CMM con IHQ positiva.

Y por último, en el grupo G14 se observó el tejido descrito en 6 casos, 4 de los cuales presentaron CMM con IHQ positiva.

En la figura 28 (A y B) se muestra una imagen en la que se observan CMM con IHQ positiva para la proteína B del surfactante pulmonar.

Tabla 26. Resultados de la IHQ en las muestras del grupo G0. En la columna de la derecha aparecen las reacciones positivas o negativas de las muestras en las que se realizó esta técnica.

MUESTRA	TEJIDO ALVEOLAR	IHQ SF-B
G0 1	0	
G0 2	0	
G0 3	0	
G0 4	2	POSITIVO
G0 5	2	POSITIVO
G0 6	1	POSITIVO
G0 7	0	
G0 8	2	POSITIVO
G0 9	0	
G0 10	0	
G0 11	1	NEGATIVO
G0 12	1	NEGATIVO
G0 13	1	POSITIVO
G0 14	0	
G0 15	2	POSITIVO

Tabla 27. Resultados de la IHQ en las muestras del grupo G7.

MUESTRA	TEJIDO ALVEOLAR	IHQ SF-B
G7 1	0	
G7 2	0	
G7 3	2	POSITIVO
G7 4	0	
G7 5	1	POSITIVO
G7 6	0	
G7 7	1	NEGATIVO
G7 8	0	
G7 9	1	POSITIVO
G7 10	1	NEGATIVO
G7 11	0	
G7 12	0	
G7 13	1	POSITIVO
G7 14	1	POSITIVO
G7 15	0	

Tabla 28. Resultado de la IHQ en las muestras del grupo GT14.

MUESTRA	TEJIDO ALVEOLAR	IHQ SF-B
G14 1	2	POSITIVO
G14 2	2	NEGATIVO
G14 3	2	POSITIVO
G14 4	0	
G14 5	0	
G14 6	0	
G14 7	0	
G14 8	1	POSITIVO
G14 9	1	POSITIVO
G14 10	2	NEGATIVO
G14 11	0	
G14 12	0	
G14 13	0	
G14 14	0	
G14 15	0	

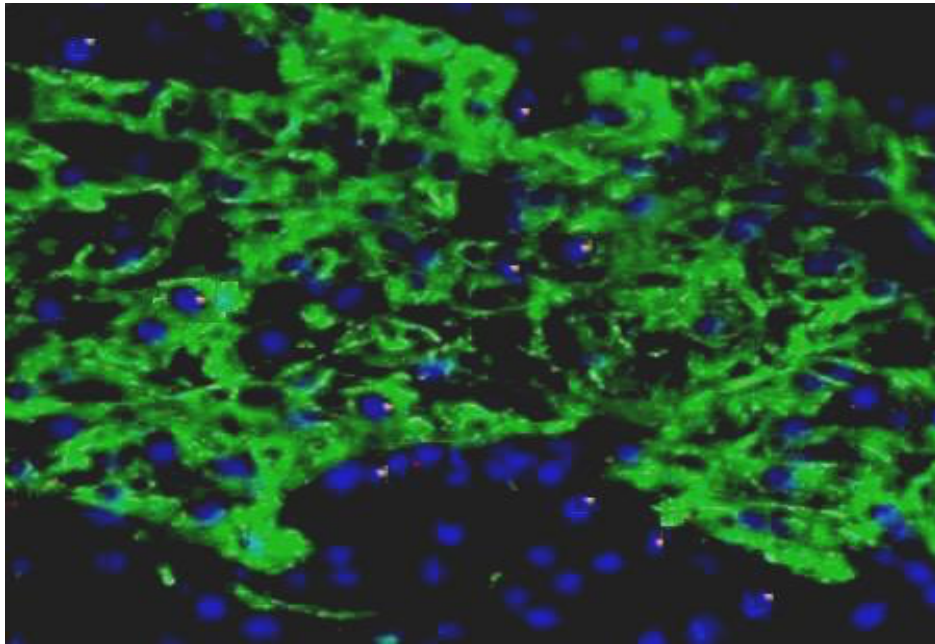
Tejido alveolar 0 = no se objetiva presencia del tejido

Tejido alveolar 1 = presencia moderada de este tejido

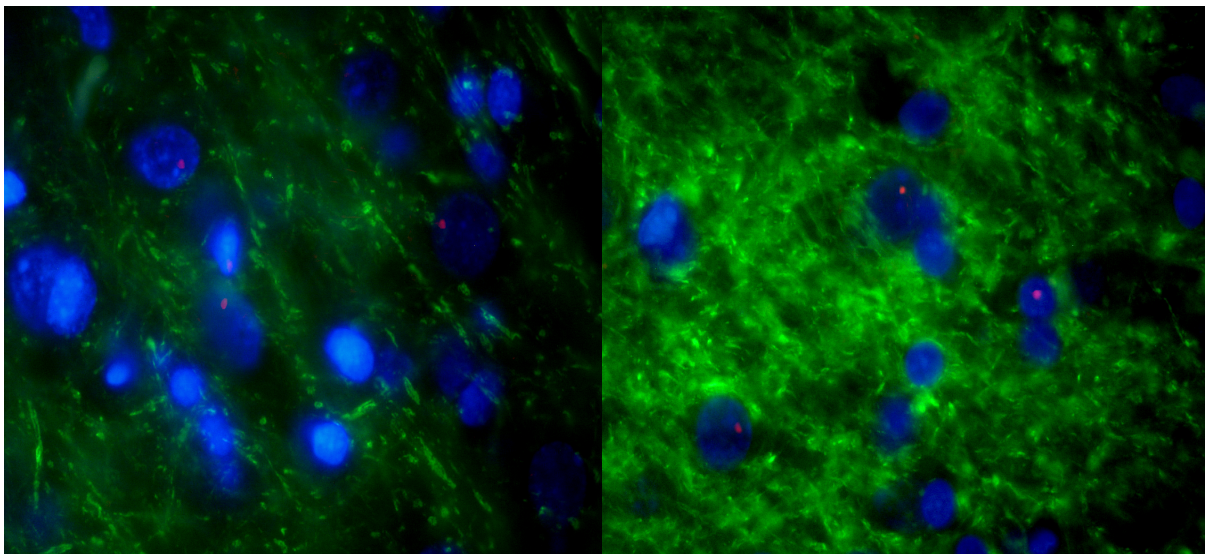
Tejido alveolar 2 = presencia en gran cantidad del tejido alveolar



Figura 28. A. Microscopio de fluorescencia (40x). El color rojo objetiva la FISH positiva para el cromosoma Y de la CMM. El color azul se debe a la tinción con DAPI, señalando la cromatina del núcleo de la CMM. El color verde representa la positividad en la reacción inmunohistoquímica al usar el anticuerpo antiproteína B del surfactante pulmonar.



B. Microscopio de fluorescencia (100X).



#### 5.4 Localización y diferenciación de las CMM

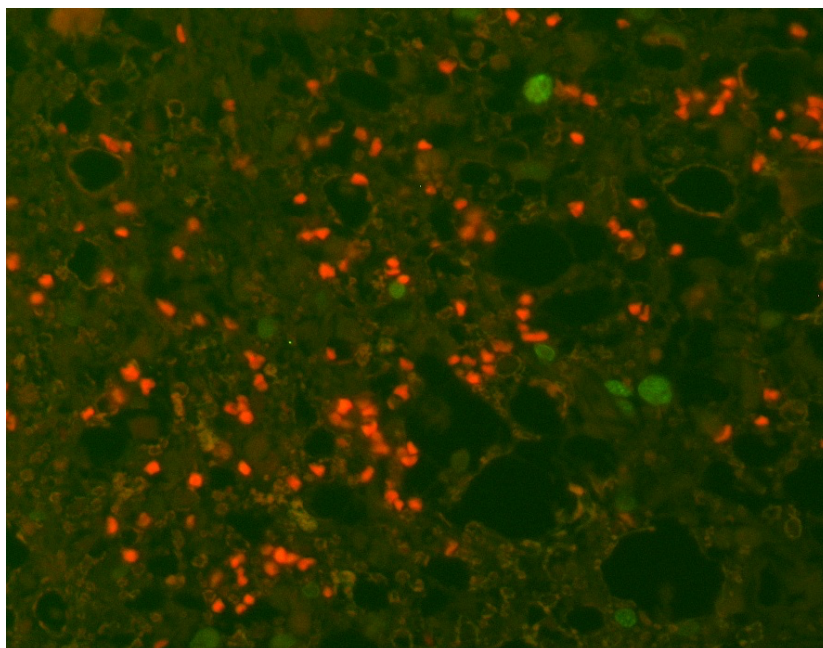
De cada uno de los segmentos traqueales recuperados se tomaron 2 cortes histológicamente significativos y sobre ellos se realizó una técnica de FISH para detectar las células madre.

Se encontraron dichas células madre en muestras correspondientes a todos los grupos temporales y por todas las vías de aplicación. En la figura 29 A y B se muestran CMM positivas para el marcador de proliferación Ki-67.

Desde el punto de vista morfológico, las células fueron detectadas en tejido correspondiente a cartílago (Figura 30) y tejido conectivo (Figura 31). Además, se han observado CMM formando parte de estructuras definidas como el endotelio de neovasos de gran calibre (Figura 32).

Por otro lado, se han detectado CMM en el seno del tejido que señalábamos como neoformado (Figura 28). Estas células, además, han sido positivas a la IHQ para la proteína B del surfactante pulmonar (color verde).

Figura 29. A. Microscopio de fluorescencia (20X). CMM positivas para el marcador de proliferación Ki-67 (núcleos verdes). Los núcleos rojos representan hematíes.



B. Microscopio de fluorescencia (100X). FISH positiva para la región Sry del cromosoma Y de las CMM. El color azul es la tinción con DAPI, señalando la cromatina de la CMM. El color verde señala la positividad para el marcador de proliferación Ki-67.

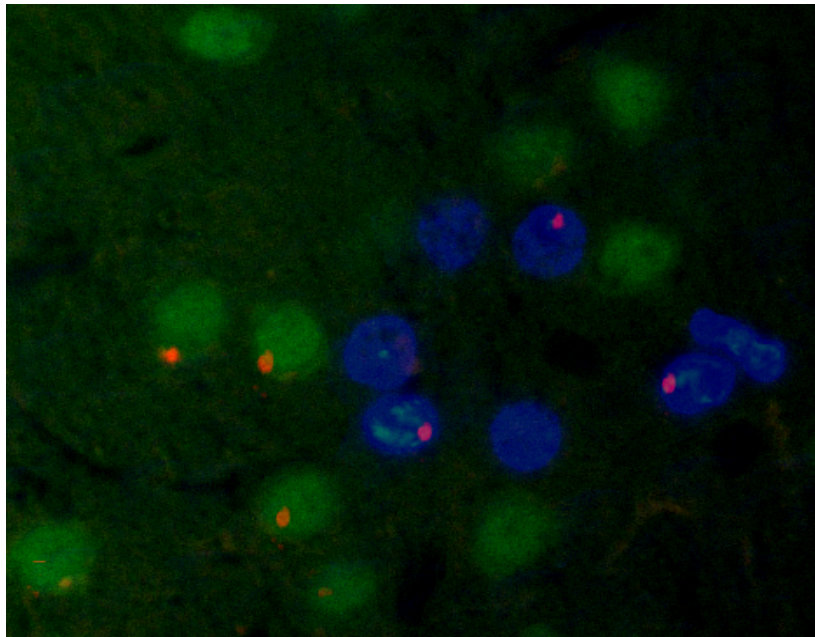




Figura 30. Microscopio de fluorescencia (40x). FISH positiva para la región Sry del cromosoma Y de las CMM, que se encuentra formado parte del cartílago del segmento traqueal.

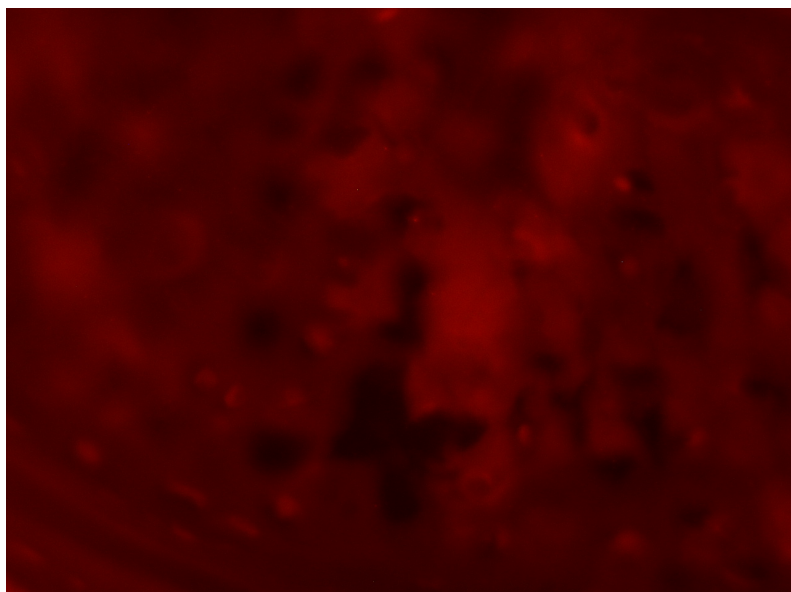
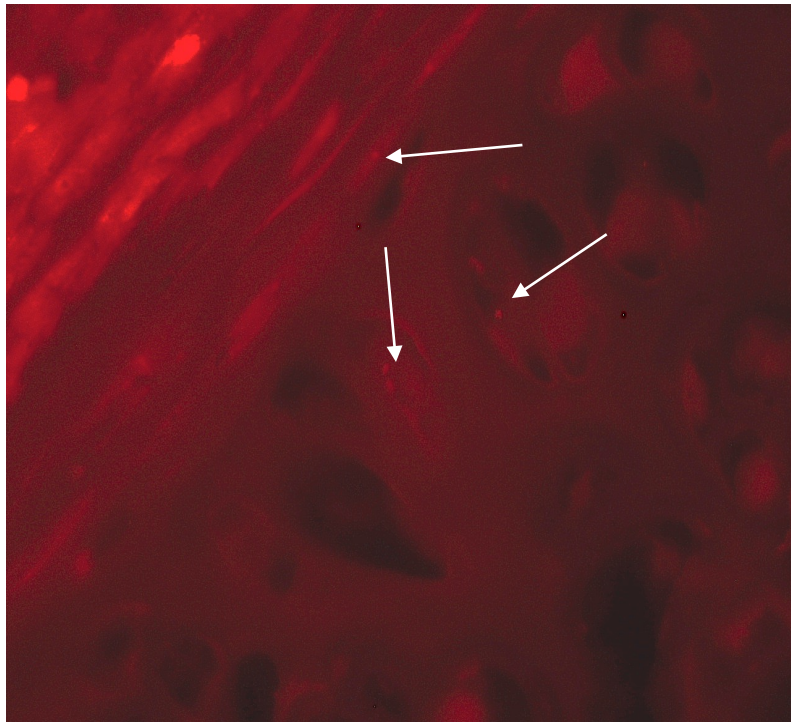




Figura 31. Microscopio de fluorescencia (40x). FISH positiva para la región Sry del cromosoma Y de una CMM formando parte de tejido conectivo presente en la luz del segmento traqueal en una muestra del grupo GT7.

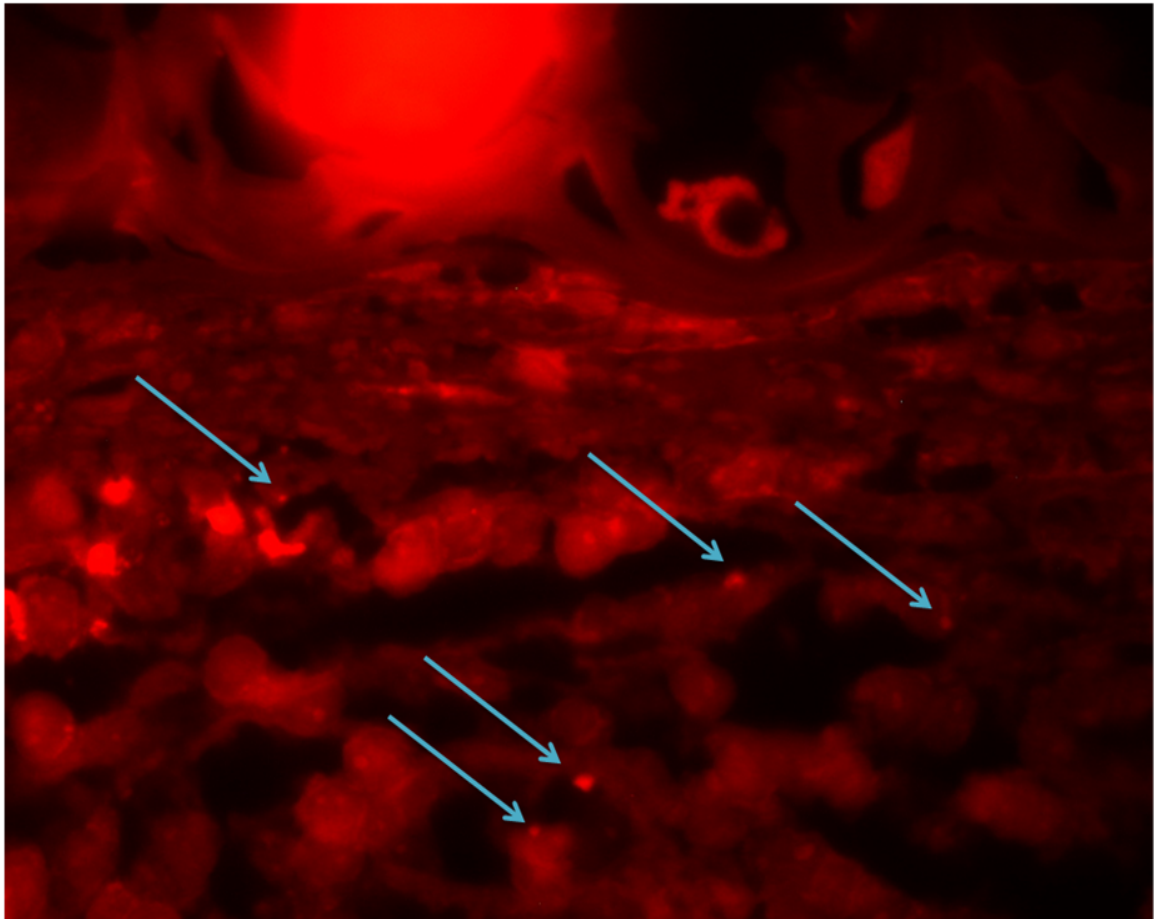
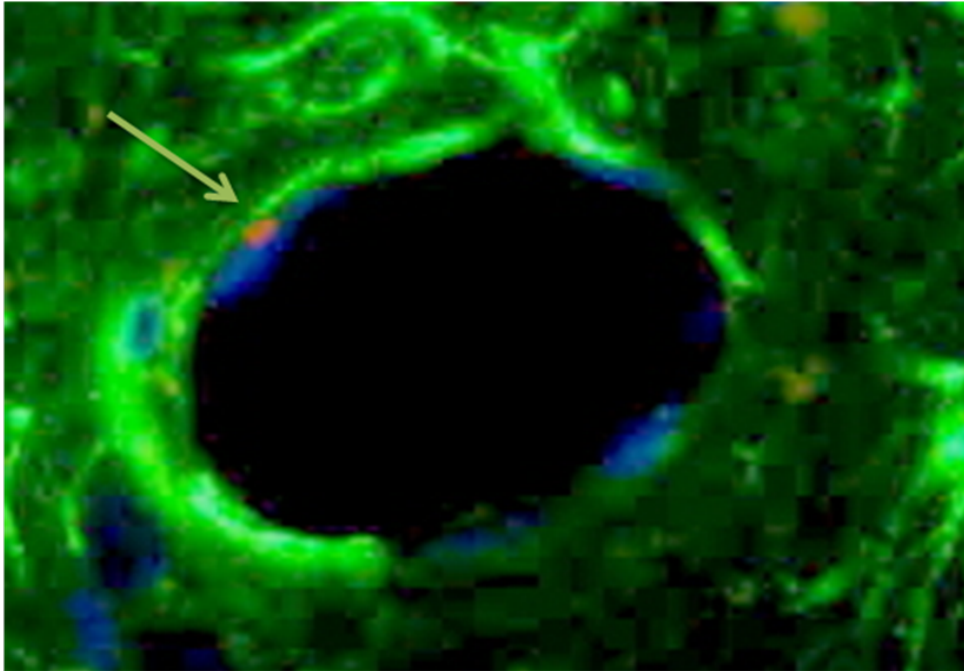


Figura 32. Microscopio de fluorescencia (100x). FISH positiva para la región Sry del cromosoma Y de una CMM formando parte de la pared endotelial de un vaso neoformado. El color verde es el marcaje que señala la vimentina.





## *DISCUSIÓN*



## 6 DISCUSIÓN

### 6.1 Modelo animal de BOS: trasplante traqueal heterotópico

La primera fase de este trabajo fue la puesta a punto de un modelo animal de BOS reproduciendo los resultados publicados en otros trabajos (243). El modelo que elegimos fue el trasplante traqueal heterotópico y se detalla tanto en el artículo derivado (247) como en el material y métodos del presente trabajo.

Idealmente, el mejor modelo para reproducir las lesiones que se producen en el rechazo crónico debería incluir un trasplante alogénico que contenga vía aérea pequeña y, además, que el injerto se encontrase en situación idéntica al escenario clínico, esto es, expuesto al aire ambiente, a la vascularización y condiciones microambientales del pulmón. Por otro lado debería permitir realizar mediciones clínicas (test de función respiratoria) y análisis inmunológicos e histológicos que fuesen indicativos de BOS.

El trasplante pulmonar ortotópico en ratones o ratas parece reunir las características descritas, si bien resulta un procedimiento técnicamente muy complejo y es costoso mantener los animales vivos el tiempo suficiente para que desarrollen el rechazo crónico. Además, es necesario atenuar el estímulo inmunológico inicial que supone un aloinjerto para evitar su destrucción por rechazo agudo y conseguir así que el injerto sobreviva lo suficiente como para desarrollar rechazo crónico (238, 249). Esto se consigue mediante tratamiento inmunosupresor o modificaciones genéticas previas sobre el receptor. Con este modelo, se han publicado resultados variables en cuanto al desarrollo de BOS. Algunos grupos consiguen reproducir fielmente la lesión del rechazo crónico (250, 251, 181) y otros, sin embargo, únicamente detectan cambios vasculares o parenquimatosos que no se asemejan a la lesión típica de BO (250-252). Por tanto, resulta más útil para el estudio de la función precoz del injerto y del daño provocado por la isquemia-reperfusión.

En cuanto a los modelos animales basados en el trasplante traqueal, están el tipo ortotópico (255) y el heterotópico. El modelo de trasplante traqueal ortotópico resulta útil para el estudio de la pérdida de microvasculatura de la vía aérea pero no reproduce de manera consistente las lesiones por BO (256).

En los modelos de trasplante traqueal heterotópico, se ha descrito el implante de un segmento traqueal en el tejido celular subcutáneo (241), en el epiplon (242) o intrapulmonar (243).

Los modelos en los que el segmento traqueal se introduce en el subcutáneo o en el omento son los más usados por ser técnicamente sencillos y altamente reproducibles. En ambas situaciones se demuestran cambios compatibles con BOS a las 3 semanas, pero se trata de injertos no vascularizados y distan mucho de encontrarse en un ambiente parecido al pulmonar.

Algunas de estas limitaciones quedaron resueltas con el recientemente descrito modelo de trasplante traqueal heterotópico intrapulmonar, que consigue reproducir adecuadamente las lesiones histológicas del rechazo crónico (243). Este modelo fue desarrollado por Dutly y colaboradores en 2004 usando ratas Brown Norway y Lewis. En este trabajo se comparan 2 grupos en cuanto a fibrosis y obliteración de la luz del segmento traqueal implantado en el pulmón de la rata receptora. El grupo isogénico estaba formado por ratas de cepas consanguíneas Lewis, de modo que donante y receptora eran genéticamente idénticas. A día 21 del trasplante, en este grupo no se encontró obliteración de la luz traqueal y el epitelio estaba completamente regenerado. El grupo alogénico, por otro lado, se realizó usando ratas Brown Norway como donantes y Lewis como receptoras. Este grupo sí mostró una histología representativa de BO, también a día 21 del implante.

En nuestro caso, teniendo en cuenta las ventajas e inconvenientes de los modelos descritos, se decidió que el trasplante traqueal heterotópico intrapulmonar reunía las características adecuadas para realizar posteriores estudios sobre prevención y tratamiento de la BOS. Se eligieron diferentes cepas no consanguíneas de ratas para establecer los dos grupos de estudio: el isogénico se realizó con ratas Wistar como donantes y receptoras, y el alogénico con ratas Lewis como donantes y Wistar como receptoras. Los resultados del trabajo mostraron que tanto el grupo isogénico como el alogénico desarrollaban cambios típicos de BO, con varios grados de obliteración de la luz del segmento traqueal, en clara progresión temporal. Sin embargo, es en el grupo alogénico donde se observan mayores grados de obliteración y fibrosis densa (247). Como se detalla en Material y Métodos (1.1 Desarrollo del modelo animal de BOS: diseño y resultados), en este grupo se produce una progresión

de la lesión intraluminal que va desde una obliteración grado 1 en el día 7 postimplante a un grado 4 en el día 21 en todos los individuos. A su vez, la luz está ocupada inicialmente por un tejido inflamatorio agudo que va tornándose en tejido de granulación y fibrosis laxa, para acabar en un tejido fibroso denso a los 21 días.

Al igual que en el trabajo de Dutly y colaboradores, se demuestra que la neovascularización del injerto traqueal se desarrolla desde los vasos pulmonares y no desde la circulación sistémica (arterias bronquiales). La neovascularización, que se observa desde fases tempranas de la lesión, va desapareciendo conforme progresa la fibrosis. Este hecho puede tener interesantes implicaciones desde el punto de vista de la administración de tratamientos con función preventiva. Por otro lado, existen algunas diferencias con dicho trabajo puesto que el grupo isogénico, en nuestro caso, desarrolla obliteración del injerto traqueal, cierto grado de fibrosis y no se observa regeneración del epitelio traqueal. Estas diferencias pueden atribuirse a que el grupo isogénico utilizado por Dutly y colaboradores está compuesta por ratas de cepas consanguíneas, con un alto grado de inmunocompatibilidad al tener la mayor parte del material genético idéntico. En nuestra experiencia, las ratas Wistar, usadas como donantes y receptores en el grupo isogénico, son de cepas no consanguíneas y por lo tanto con menor grado de histocompatibilidad, lo que puede justificar los cambios histopatológicos encontrados.

En conclusión, este modelo resulta técnicamente sencillo, reproducible y permite el estudio de los cambios histopatológicos típicos de BO que se suceden sobre el injerto traqueal en un microambiente muy similar al clínico, dado que la secuencia histológica que se observa y el resultado final en forma de lesión fibrosa es muy similar a la que se produce en la BO. En este sentido, los resultados aportados por este modelo hacen que se siga utilizando y justificarían el paso a modelos similares en animales grandes. Pese a ello, presenta varias limitaciones. La primera es que sigue sin ser un injerto vascularizado ni en contacto con la vía aérea del receptor, lo que hace que no esté expuesto a los mismos agentes dañinos/nocivos que pueden desencadenar o favorecer el desarrollo de BOS. Otra de ellas, es que la lesión típica de la BOS se produce sobre la vía aérea pequeña y en este caso se trata de un segmento traqueal de 1-2 mm de diámetro. Y por último, este modelo no permite la evaluación del deterioro funcional del receptor que se constata en los pacientes con BOS.



Durante la fase de consecución del modelo no se registró mortalidad ni intra ni postoperatoria. Todos los individuos sobrevivieron al procedimiento hasta la fase de eutanasia.

Sin embargo, hubo una mortalidad del 6.6% (3 casos) en la fase de aplicación de las CMM. Dos animales fallecieron durante la aplicación de CMM por vía vascular y el otro al tercer día postoperatorio (Vía V). La causa en los dos primeros casos fue una obstrucción aguda de las cavidades derechas por una concentración excesiva de CMM o un volumen inadecuado del plasma en el que van suspendidas las CMM. El problema se resolvió empleando una concentración y un volumen menores, y realizando las infusiones de manera más lenta.

## 6.2 Papel de las CMM en el modelo animal de BOS

Como apuntábamos en la introducción, la BOS es la principal causa de mortalidad a largo plazo en el trasplante pulmonar, llegando a ser del 50% a los 5 años (131). Si bien han sido definidos varios subtipos de rechazo crónico, el fenotipo BOS sigue siendo el más frecuente, por lo que está justificado perseverar en el estudio de los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a esta entidad, puesto que no existe en la actualidad ningún tratamiento eficaz para la misma. De igual manera, y aunque se conocen algunos de los factores de riesgo asociados, no se ha podido aplicar ninguna terapia con carácter preventivo.

En este sentido, y teniendo en cuenta el potencial que han demostrado las CMM en diversas áreas de la reparación y regeneración tisular, diferentes grupos han desarrollado trabajos en los que se evalúa el efecto de este tipo de células en modelos animales de BOS.

Grove DA y colaboradores (101) describen en 2011 una atenuación en la obstrucción de la luz de la vía aérea tras el trasplante de CMM en un modelo de BOS basado en el trasplante traqueal heterotópico en ratones (implante en tejido celular subcutáneo). En este trabajo se compara el grado de oclusión de la luz del segmento

traqueal implantado y la expresión de citoquinas profibróticas tanto intraluminales (TGF-beta) como en plasma (G-CSF y IL-10). Para ello, toman 2 cepas murinas (C57BL/6, BALB/c) y hacen varios grupos, uno de ellos en el que el injerto proviene de un ratón de la misma especie que el receptor (isoinjerto: usando la variante C57BL/6), otro en el que proviene de ratones de una especie diferente (aloinjerto: usando la variante BALB/c como donante del injerto traqueal y como receptora la C57BL/6), y otros tres grupos más de aloinjertos a los que se les trasplantan CMM provenientes de 3 cepas (C57BL/6, BALB/c y CH3). Las CMM son trasplantadas mediante una inyección retroocular el mismo día en el que se realiza el implante subcutáneo del segmento traqueal y todos los animales son eutanasiados y las muestras extraídas a los 10 días del procedimiento. Tras el análisis de las muestras encuentran diferencias entre el grupo de isoinjertos y el de aloinjertos en cuanto al grado de inflamación intraluminal, depósito de colágeno, daño del epitelio y obstrucción de la luz del segmento traqueal, siendo significativamente mayores en el grupo de aloinjertos. Sin embargo, en los grupos que reciben las CMM se observan menor obliteración y menor fibrosis. En cuanto a la expresión de TGF-beta, ésta se encuentra significativamente aumentada en el grupo de aloinjertos cuando se compara con el grupo de isoinjertos y aloinjertos que reciben CMM. Estos datos sugieren el papel protector de las CMM frente a la respuesta fibrótica intraluminal.

Guo y colaboradores comunicaron sus resultados al aplicar CMM por vía intravenosa en un modelo de trasplante traqueal ortotópico en ratones. En este trabajo también se aplican las CMM el mismo día del trasplante traqueal. Con respecto al grupo control (que recibió suero salino en vez de CMM) encontraron que las CMM eran capaces de detener el desarrollo de OB en este modelo actuando sobre la función de los macrófagos, disminuyendo la secreción de IL-6 y TNF-alfa, y aumentando la expresión de IL-10 (257).

Más recientemente, Casey y colaboradores (245) han publicado un trabajo usando un modelo animal basado en el trasplante traqueal heterotópico (subcutáneo) entre ratas C57BL/6 y BALB/c, que son cepas genéticamente tratadas para la expresión de diferentes complejos mayores de histocompatibilidad (MHC), lo cual garantiza el rechazo crónico del injerto. Se realiza un trasplante de CMM en 3 grupos problema y lo comparan con un grupo control sin CMM. Los 3 grupos problema difieren en la vía de aplicación: por vía tópica (la aplicación se realiza directamente sobre la luz

del injerto traqueal, cerrando los extremos del mismo con 2 puntos de sutura), intravenosa (vía retroocular) y una combinación de ambas. El trasplante de las CMM se realiza el mismo día del injerto traqueal en el tejido subcutáneo y los tiempos a los que analizan las muestras son a los 2 días, 1, 2 y 4 semanas. En cuanto a los resultados, observan que el grupo que recibe las CMM por vía combinada, intravenosa y tópica, presenta una reducción en la infiltración por neutrófilos en el injerto traqueal durante la fase precoz de la respuesta inflamatoria, una reducción del acúmulo de macrófagos y menos fibrosis en la semana 4. También a la cuarta semana observaron que la respuesta inflamatoria de células T estaba disminuida, independientemente de la vía de administración de las CMM. Por otra parte, no encuentran células madre repoblando o regenerando el epitelio de los injertos traqueales (éste se pierde durante las fases precoces del desarrollo de BO). En cuanto a la obliteración de la luz del injerto, no encuentran diferencias entre los grupos que reciben CMM y el grupo control, al contrario que el grupo de Grove (101). Este grupo concluye que las CMM producen una reducción en el daño tisular, en la inflamación y en el desarrollo de fibrosis del injerto debido a su carácter inmunomodulador paracrino, apoyados en que las CMM no requieren integrarse en el epitelio traqueal y regenerarlo para producir estos efectos, sino que son capaces de excretar factores solubles que pongan en marcha diferentes mecanismos reparadores. Por otro lado, se ha propugnado que la integridad del epitelio previene la obliteración de la luz traqueal en un modelo animal de BOS (258), por lo que este grupo justifica la falta de reducción de la obliteración por la nula regeneración del epitelio por parte de las CMM. En cuanto a la vía de administración óptima de las CMM, sugieren que la vía combinada local e intravenosa aporta la sinergia del efecto local y sistémico de las CMM.

En el presente trabajo, nos planteamos el problema desde una óptica similar aunque con matices importantes, diseñando un estudio en el que se pudiera evaluar la vía de administración de CMM, el tiempo que transcurre entre el estímulo para el rechazo (implante del segmento traqueal) y el trasplante de las células, y el propio efecto preventivo de éstas en el rechazo crónico. Todo ello con el objetivo de comparar los resultados con el modelo animal de BOS reproducido satisfactoriamente y basado en el trasplante traqueal heterotópico intrapulmonar en el que donante y receptor son de diferentes cepas de ratas.

Uno de los hallazgos más llamativos al examinar la histología ha sido la

presencia del citado *nuevo patrón 2+3*, que se observa en un importante número de individuos de los 3 grupos (86% en el G0, 53% en el G7 y 57% en el G14). Este patrón, definido en los resultados, se caracteriza por ser un tejido con una ingente cantidad de neovasos de gran calibre en el lecho de un tejido fibroso muy laxo. Según el modelo de rechazo crónico (247), todos los individuos a los 21 días del injerto traqueal deberían presentar una obliteración completa de la luz por un tejido fibroso denso y sin neovasos. La presencia de ese tejido consistente básicamente en neovasos en el seno de un estroma levemente fibroso sugiere cierto grado de remodelación tisular que está impidiendo el desarrollo de la lesión tipo BO, cambiando, al aplicar las CMM, el curso histopatológico que habíamos observado en el modelo.

Los mecanismos íntimos implicados que subyacen a este efecto pueden ser varios. Está descrito que el mecanismo paracrino (259) es uno de los que más peso tiene en los efectos de las CMM. Tras detectar que el microambiente es de características proinflamatorias y de proliferación fibrosa, producen y secretan factores tróficos, citoquinas antiinflamatorias y agentes antiproliferativos, estimulando la neoangiogénesis (260) y disminuyendo el grado de fibrosis. Además, hemos detectado CMM formando parte del endotelio de los neovasos que describíamos en el tejido que ocupa la luz del injerto traqueal (Figura 32). Este hallazgo sugiere que las CMM no sólo favorecen la formación de vasos mediante la secreción de factores tróficos creando el microambiente adecuado (261), sino que también son capaces de diferenciarse y participar de la arquitectura de la neovascularización. En cualquier caso, se confirma el potencial de las CMM para generar tejido vascular y diferenciarse a células endoteliales (261, 262).

En cuanto a la obliteración, no encontramos diferencias significativas entre el grupo de individuos G7 y el grupo control, pero al realizar el análisis del grupo G7 considerando la vía de administración de las CMM (T, V y P), observamos que las diferencias se concentran en el subgrupo que recibe las células por vía intratraqueal (G7\_T). Estos hallazgos sugieren que la aplicación de las CMM por esta vía y con una diferencia de 7 días entre el injerto traqueal y el trasplante de las células, es la combinación óptima que produce una reducción significativa en la obliteración de la luz. Al contrario que en otros estudios, no parece ser necesaria la regeneración del epitelio de la luz traqueal para que se produzca una menor obliteración de la vía aérea (101, 257).

Por otro lado, ni el grupo G0 ni el G14 muestran menos obliteración que el grupo control. Sin embargo, en la mayor parte de los casos, la luz del injerto traqueal se encuentra obliterada por un tejido compuesto del *patrón 2+3* antes mencionado. Por lo tanto, si bien es cierto que cuantitativamente la obliteración en esos individuos es comparable a la del grupo control, cualitativamente es radicalmente diferente.

La fibrosis intraluminal detectada en el G7 también es significativamente menor que la que se observa en el grupo control. De nuevo el subgrupo G7\_T es en el que mejor respuesta se encuentra (ningún caso presenta fibrosis). Esto parece confirmar la vía intratraqueal como la vía óptima de aplicación de CMM. Los grupos G0 y G14 no presentan diferencias con el grupo control en cuanto a la fibrosis intraluminal. Exceptuando que en el grupo G14 se encuentran 4 individuos con patrón 3 en los que se evidencia una fibrosis grado 2, hay que tener en cuenta que estos grupos presentan un alto porcentaje de casos con el *patrón 2+3*, formado también por tejido conectivo que aunque contiene colágeno, la tinción tricrómica demuestra que es en pequeña cuantía. Este hallazgo es no sólo consistente con los resultados de otros grupos que trabajan con modelos animales de BOS (101, 245), sino también con los resultados observados en modelos de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en los que las CMM son capaces de disminuir la respuesta fibroproliferativa (263-265).

Una de las propiedades que se les atribuye a las CMM es la capacidad de modular los procesos inflamatorios (124). En el presente trabajo no es posible obtener conclusiones acerca de la inflamación debido a que, lógicamente, en el grupo control no se observan infiltrados inflamatorios puesto que se trata de un modelo de BOS, donde lo que se observa es una ocupación de la luz traqueal por una cicatriz fibrosa. No obstante, en la mayoría de los individuos en los que se detecta infiltrado inflamatorio al aplicar las CMM, éste es muy leve (grado 1) independientemente de la vía de administración y del momento en el que se apliquen.

En definitiva se observa que el trasplante de CMM es capaz de modificar el curso histopatológico del modelo de BOS en todos los grupos problema, cambiando el patrón histológico fibroso final observado en dicho modelo por otro en el que hay un predominio de neovasos sobre un estroma levemente colágeno, lo que sugiere cierto grado de reparación tisular. Este efecto es más llamativo en el grupo G7, donde se aprecia una reducción significativa de la fibrosis. En el subgrupo G7\_T, además, se

produce una disminución significativa de la obliteración de la luz del injerto traqueal.

### 6.3 Papel de las CMM en los procesos de reparación y regeneración pulmonar

Hoy en día la comunidad científica internacional no tiene dudas de la participación de las CMM en los diferentes procesos de reparación y regeneración tisular. Como hemos comentado previamente, se han identificado nichos de CMM en tejidos adultos preparadas para autorregenerarse, proliferar y diferenciarse a la célula adulta en respuesta a determinados estímulos que son percibidos como daño tisular (266). Es más, cuando se administran CMM heterólogas, éstas son capaces de dirigirse a las localizaciones dañadas y participar allí en la reparación del tejido, bien mediante la secreción de factores de crecimiento, o bien induciendo a las células del tejido circundante a secretar factores tróficos (266).

No obstante, la vía óptima de aplicación de estas CMM, la dosis necesaria para que el tratamiento pueda ser eficaz, la capacidad de anidar en el tejido, el tiempo que necesitan estar expuestas al estímulo dañino, la vehiculización y los mecanismos a través de los cuales llevan a cabo esta función aún no están perfectamente definidos.

Entre los mecanismos de acción descritos encontramos el contacto celular directo, mediante el cual son capaces de anidar en el tejido dañado, y el ya comentado efecto paracrina. Teóricamente las CMM serían capaces de “detectar” las condiciones en las que se encuentra el tejido y responder a través de la secreción de un variado repertorio de citoquinas y otros productos, cuyas funciones son la quimiotaxis de determinados grupos celulares, promoción de la proliferación de otros, inhibición de los procesos apoptóticos, neoangiogénesis y la inmunomodulación de la respuesta inflamatoria. De hecho, se postula que serían capaces de modular su respuesta según el microambiente al que son sometidas, lo que podría ser fundamental en la eficacia esperada (266). Todas estas funciones resultan clave en la reparación del daño y en la regeneración tisular.

Otro de los mecanismos de acción propuestos es la diferenciación y proliferación

hacia un tipo celular concreto. Está bien documentada la diferenciación hacia condrocitos, adipocitos, osteocitos, hepatocitos, miocitos e incluso neuronas (267-269). Es más, algunos autores han publicado la capacidad de las CMM para transdiferenciarse, esto es, diferenciarse a un tipo celular de una hoja embrionaria diferente a la propia. Zhen y colaboradores (270) demostraron en un modelo animal (ratas) de enfisema pulmonar que las CMM trasplantadas a través de la vena de la cola eran capaces de anidar en el pulmón lesionado y diferenciarse a neumocitos tipo II. No obstante, otros autores proponen otras vías que explican la diferenciación de las CMM a linajes celulares de otra hoja embrionaria, como son los mecanismos de fusión celular con células residentes en el tejido (43-50).

Entre los hallazgos histológicos de nuestro trabajo hemos detectado un tejido aparentemente neoformado que aparece en contigüidad o próximo a las zonas de la luz del segmento traqueal donde identificábamos el *patrón 2+3*. Este tejido en algunos cortes recuerda la estructura histológica del pulmón, y en otros está compuesto de abundantes neovasos de gran calibre. En la seriación del bloque podía observarse como en los cortes sucesivos a los grandes neovasos aparecía ese tejido alveolar neoformado. Para caracterizarlo fenotípicamente y saber si contenía CMM, se realizó una FISH para detectar la región Sry del cromosoma Y murino, y una IHQ para detectar un marcador del neumocito tipo II (proteína B del surfactante pulmonar). En la mayoría de las muestras donde se analiza el tejido neoformado se encuentran células que se marcan simultáneamente con estas dos técnicas, objetivando que las CMM se han diferenciado a neumocitos tipo II o, al menos, son capaces de expresar marcadores de estas células epiteliales pulmonares. Estos hallazgos son consistentes con los resultados del trabajo de Zhen y algunos otros (270-272). Por otro lado, existen trabajos que demuestran la diferenciación de las CMM a neumocitos tipo I en un modelo de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina (273) e, incluso, otros autores que demuestran que pueden diferenciarse a neumocitos tipo I, tipo II, fibroblastos y mioblastos (274). Según Zhen y colaboradores, esta variabilidad puede explicarse por las diferentes condiciones de cultivo de las CMM, los distintos tipos de lesiones que se provocan en los modelos animales y los diferentes métodos usados para caracterizar fenotípicamente a las CMM (270). Lo cierto es que en nuestro caso se ha usado un solo marcador de células alveolares epiteliales, por lo que no podemos aseverar que

estas CMM no estén expresando marcadores de otro tipo de células que formen parte del tejido alveolar.

En cualquier caso, parece claro que las CMM trasplantadas son capaces de diferenciarse a células epiteliales alveolares tipo II en un intento de ejercer una respuesta reparadora regenerando el tejido.

En las muestras analizadas también expresan proteína B del surfactante pulmonar otras células que no han sido positivas a la FISH. No es posible saber si esas células también son CMM, puesto que la región Sry del CrY puede haber quedado fuera del corte y por lo tanto no se detectaría, o bien se trata de células del tejido pulmonar circundante que responden proliferando a los factores tróficos secretados por las CMM.

Por otro lado, las CMM detectadas eran viables y proliferaban, puesto que las tinciones con DAPI y Ki-67 fueron positivas (Figuras 28 y 29). Diferentes trabajos han documentado que la proliferación en exceso o de manera descontrolada de las CMM puede dar origen a teratomas. Las células madre de origen somático tienen un menor riesgo de producir tumoraciones que otras células madre como las embrionarias, ya que son más sensibles a los procesos de control de proliferación celular (275). No obstante, han de ser sometidas a manipulaciones, cultivo y a procesos de expansión celular, por lo que teóricamente pueden desarrollar mutaciones que acaben expresándose en forma de tumores, como muestran algunos trabajos (276-279). Para que estas células puedan saltarse los controles del ciclo celular y comenzar con una eventual transformación tumoral se necesita un tiempo de cultivo *in vitro* de más de 4 meses. En el presente trabajo se han utilizado CMM con un periodo máximo de cultivo de 2 semanas, tiempo insuficiente para dar lugar a la generación de cambios con potencial maligno. En un trabajo del propio grupo en el que se evaluaba el efecto de las CMM sobre la cicatrización bronquial en un modelo murino de neumonectomía izquierda, se ha encontrado un índice de proliferación de las CMM de entre el 1 y el 2.5% sin evidencia de generación de tumores en ningún individuo (124). Además, tras una amplia fase preclínica, en nuestro centro están en marcha varios ensayos clínicos con CMM (tanto autólogas como alogénicas) en pacientes con lesiones medulares en los que no se han detectado tumores ni otros problemas asociados.



#### 6.4 Momento del trasplante de CMM

Como se define en Material y Métodos se establecen 3 grupos determinados por el tiempo al que se trasplantan las CMM desde el injerto del segmento traqueal. Los efectos más contundentes en cuanto a disminución de la obliteración y fibrosis se encuentran en el grupo G7 (las CMM se trasplantan tras 7 días del implante del segmento traqueal donante), siendo por lo tanto el mejor momento para incidir sobre el desarrollo de la lesión de BO, favoreciendo la prevención de la fibrosis final.

Cuando las CMM se trasplantan el mismo día que el injerto traqueal (G0), éstas deben actuar sobre una lesión más aguda de tipo inflamatorio, como se describe en el modelo (247), por lo que no encuentran los estímulos adecuados para prevenir obliteración y fibrosis, aunque son capaces de impedir el estadio final de la lesión de BOS.

Por último, las CMM trasplantadas a los 14 días del implante del segmento traqueal deben actuar en un escenario en el que la lesión ya está en estadios avanzados, con un patrón histológico 2 ó 3 donde la fibrosis laxa es predominante. En esta fase las CMM no ejercen los efectos suficientes para revertir la lesión.

#### 6.5 Vías de administración y dosis de CMM

Dependiendo del tipo de patología a estudio, los diferentes trabajos publicados utilizan distintas vías de administración para el trasplante de CMM.

En aquellos relacionados con modelos animales de bronquiolitis obliterante es común el uso de las vías intravenosa e intratraqueal. La administración intravenosa suele ser mediante la inyección retroocular de las CMM (101) o a través de la vena de la cola (262). En cuanto a la administración intratraqueal, suele referirse a la administración dentro de la luz del propio injerto traqueal donante en el que cual se quiere reproducir el rechazo crónico y sobre el que se quiere estudiar el efecto de las CMM (245).

Por el contrario, en los trabajos en los que se estudian lesiones pulmonares agudas tipo distrés respiratorio, o en modelos animal de fibrosis pulmonar, la administración intratraqueal se realiza inyectando las CMM en la vía aérea principal, con el objetivo de que se dispersen lo más ampliamente posible (280).

En este trabajo se decidió evaluar 3 vías diferentes de trasplante de CMM pensando en una futura aplicación clínica.

En la vía intravascular la infusión de las CMM se realizó en la confluencia de vena yugular y subclavia en la vena cava superior. Existen trabajos, como el de Liu y colaboradores, en el que realizan el trasplante de CMM a través de la vena de la cola, y detectan de manera cualitativa que las CMM se depositan fundamentalmente en el pulmón y en el hígado (280). A priori, ésto garantizaría que gran parte de las CMM trasplantadas queden en el órgano diana a pesar de que la administración sea periférica. No obstante, en otros trabajos se observa que administrando las CMM por vía yugular, únicamente alrededor de un 3% de las células son capaces de traspasar el filtro pulmonar (281). Por esta razón, se decidió usar la vía vascular central con el objetivo de no perder CMM en otros órganos (101, 262, 280). Las CMM aplicadas por esta vía fueron detectadas tanto en el interior del injerto traqueal como el parénquima pulmonar circundante, por lo que se consiguió el objetivo de garantizar la mayor cantidad de células en el pulmón.

En cuanto a la vía intratraqueal, no sólo se encontraron CMM dentro del injerto traqueal, sino que se detectó un cambio en el curso histopatológico de la lesión típica de BO acompañado de cierto grado de regeneración tisular. Además, concretamente en el grupo G7 se observó una disminución significativa de la fibrosis y una mejora también significativa de la obliteración de la luz en el subgrupo G7\_T. Pensamos que esta vía es la óptima para plantear un eventual uso clínico de las CMM.

La vía intraparenquimatosas o tópica, es teóricamente por la que las CMM podrían llegar en mayor número y ejercer mejor su acción. Por esta vía también se encontraron CMM en todas las muestras analizadas, tanto en el injerto traqueal como, lógicamente, en el parénquima de alrededor. Los efectos, sin embargo, no fueron mejores que en los individuos que recibieron CMM por vía intratraqueal.

Un aspecto importante a tener en cuenta es el número crítico de CMM que es necesario trasplantar para tener el efecto terapéutico deseado. Son numerosos los trabajos en la literatura que apoyan la dosis dependencia existente entre el número de CMM trasplantadas y la recuperación funcional (282-284) sugiriendo que el número de células administrado es un factor determinante para lograr el efecto terapéutico que se busca. No obstante, tenemos que tener en cuenta que a pesar de que el número de células madre administrado es un factor crítico, no es el único determinante de la eficacia de este tipo de terapias, puesto que las investigaciones actuales que se están desarrollando en el campo de la terapia celular van dirigidas a lograr aumentar la supervivencia e integración a largo plazo de las células trasplantadas en el tejido dañado.

Por otra parte, una dosis excesiva de CMM podría no tener los efectos que se pretenden. En un reciente trabajo donde se estudia el efecto dosis-dependiente de la administración intraarterial de CMM en un modelo murino de ictus, se detecta que la aplicación de las concentraciones de CMM más bajas testadas ( $1 \times 10^5$  en 0.5 ml de PBS) producen una reducción del flujo en la arteria cerebral media parecido al placebo, mientras que las dosis más altas ( $1 \times 10^6$  en 0.5 ml de PBS) muestran obstrucción de la microvasculatura cerebral por las propias CMM (285).

Junto con el número de células trasplantadas y su supervivencia, otro factor determinante en la eficacia de la terapia celular es la liberación de factores tróficos propios del tejido, la mayoría de los cuales están relacionados con la propia fisiopatología del daño tisular, y que a su vez están relacionados con el aumento de la supervivencia de las células trasplantadas (286).

En base a la experiencia de nuestro hospital en este tipo de terapias avanzadas, hemos determinado para el tratamiento de nuestros animales la dosis “máxima” posible en función de la vía de administración a utilizar. Este es un parámetro que debemos tener muy en cuenta por las complicaciones que pueden surgir solo como consecuencia de la vía de administración elegida. Por ello, manteniendo el criterio de utilizar la máxima dosis posible de CMM, se ha calculado un volumen y una concentración de CMM adecuada a la vía de administración elegida que nos asegurara no tener complicaciones.

Para la vía intrapulmonar se eligió un volumen de 250 microlitros de medicación por animal a una concentración de  $60 \times 10^6$  / ml para evitar aglomeraciones perilesionales en forma de abscesos que no permitiesen a las CMM migrar adecuadamente y pudiesen comprometer su supervivencia.

Para la vía intratraqueal se eligió un volumen de 500 microlitros de medicación por animal a una concentración de  $14 \times 10^6$  / ml con la intención de evitar tapones que pudieran provocar la obstrucción parcial o total de la tráquea o de algún bronquio principal de la rata, lo cual comprometería gravemente la supervivencia del animal.

Por último, para la vía intravascular se decidió utilizar un volumen de 300 microlitros de medicación por animal a una concentración de  $5 \times 10^6$  / ml. Los dos primeros individuos de todo el trabajo que recibieron CMM por esta vía sufrieron una parada cardiorrespiratoria segundos después de la infusión de las CMM suspendidas en plasma a una concentración de  $15 \times 10^6$  / ml. La concentración excesiva de CMM infundidas directamente en el sistema vascular podría haber provocado un trombo en el corazón derecho de la rata, y/o el volumen empleado (1 ml), aplicado directamente en la entrada de la aurícula derecha podría haber sobrecargado de forma aguda el ventrículo derecho del animal.

## 6.6 Limitaciones

Este trabajo está basado en un modelo animal de BOS que requiere el trasplante de un segmento traqueal en localización heterotópica (parénquima pulmonar). El propio modelo tiene limitaciones en cuanto a la reproducción de la lesión a estudio, tal y como quedan expuestas al comienzo de la discusión (punto 1).

Por otro lado, no disponemos de evidencia en cuanto a la cantidad mínima de CMM que es capaz de actuar mejorando la lesión de BOS a través de las vías de trasplante seleccionadas. Pensamos que aportar la dosis máxima posible de CMM que el individuo tolerase por cada vía de administración podría asegurar que anidaran en el tejido diana en una cantidad suficiente para poder provocar cambios histológicos

medibles. Sin embargo, sería muy interesante desarrollar un modelo en el que se estudiase la dosis mínima capaz de atenuar el desarrollo de BOS.

Aunque hemos sido capaces de encontrar cambios en el desarrollo histopatológico de la lesión típica de BO al aplicar CMM, no se han realizado mediciones de citoquinas proinflamatorias ni otros mediadores que puedan estar implicados en la fisiopatología del rechazo crónico, o que sean secretados por las propias CMM.

Quedaría también por determinar si el mecanismo último por el cual las CMM expresan marcadores de células epiteliales alveolares es la transdiferenciación o la fusión celular. La fusión celular requeriría contacto entre la CMM y el epitelio alveolar seguido del propio proceso de fusión y de la migración de la célula resultante hacia la zona problema. Por otro lado, con las técnicas aplicadas no es posible precisar si la proteína B del surfactante pulmonar que producen estas CMM forma parte del complejo funcionalmente activo.

En este trabajo, debido a la limitación del tamaño de muestra, existen errores de tipo II inevitables, es decir que en ocasiones no se encuentren diferencias que en realidad pueden existir. Este tipo de error solamente se corrige aumentando el tamaño de la muestra. Por ello, no descartamos que alguna de las otras vías de administración u otros momentos de trasplante de CMM puedan ofrecer resultados similares a la vía intratraqueal.

## *CONCLUSIONES*



## 7 CONCLUSIONES

1. El modelo de BOS basado en el trasplante traqueal heterotópico intrapulmonar es un procedimiento sencillo, reproducible y satisfactorio para el estudio tanto del desarrollo de la lesión histológica del rechazo crónico, como de la aplicación de terapias con intención preventiva.

2. Las CMM aplicadas a diferentes tiempos y por diferentes vías son capaces de cambiar el curso histopatológico de la lesión típica de BO. Se ha observado un patrón histológico no presente en el modelo de BOS que sugiere un efecto reparador de las CMM.

3. Se han encontrado CMM formando parte del endotelio de estructuras vasculares, cartílago y tejido conectivo. Además, se han detectado formando parte del tejido neoformado en la luz del injerto traqueal con capacidad de expresar marcadores de células epiteliales pulmonares (neumocitos tipo II). Este hecho, sugiere que la presencia de las CMM produce cierto grado de regeneración tisular remedando el tejido circundante.

4. El trasplante de CMM a 7 días del injerto del segmento traqueal (grupo G7) consigue una disminución significativa de la fibrosis. Además, cuando estas células se trasplantan por vía intratraqueal (subgrupo G7\_T) se observa una reducción significativa de la obliteración de la luz del segmento traqueal. Por tanto, ésta se propone como la mejor vía para la aplicación de las CMM.





## **BIBLIOGRAFÍA**



## 8 BIBLIOGRAFÍA

1. Rao, M. S.; Mattson, M. P. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev.* 2001 May;122(7):713-734.
2. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 14, 1419-1430.
3. Metcalf D, Moore MAS. Hematopoietic cells, 1971. Amsterdam: North-Holland.
4. Weisman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:387-403.
5. Weisman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 200;100:157-68.
6. Alison MR, Poulson R, Forbes S, Wright NA. An introduction to stem cells. *J Pathol.* 2002 Jul;197(4):419-423.
7. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998 Nov;282(5391):1145-1147.
8. Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: Hype and reality. *Hematology* 2002;1:369-91.
9. Thomson JA, Odorico JS. Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines. *Triends Biothec* 2000;18:53-7.
10. Rossant J. Development of the extraembryonic lineages. *Sem Cell Dev Biol* 1995;6:237-47.
11. Desbaillets J, Ziegler U, Groscurth P, Gassmann M. Embryoid bodies: An in vitro model of mouse embryogenesis. *Exp Physiol* 2000;85:645-51.
12. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292:154-6.
13. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kina AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385:810-3.
14. Lanza R, Cibelli J, Faber D, Sweeney R, Henderson B, Nevala W, West M, Wettstein P. Clonic cattle can be healthy and normal. *Science* 2001; 294:1893-4.
15. Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. *N Engl J Med* 2003;349:275-86.
16. Carpenter MK, Inokuma MS, Denham J, Mujtaba T, Chiu CP, Rao MS. Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Exp Neurol* 2001;172: 383-97.
17. Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, et al. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001;19:1134-40.
18. Schuldiner M, Eiges R, Eden A, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Goldstein R, Benvenisty N. Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Brain Res* 2001;913:201-5.
19. Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10716-21.
20. Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001; 50:1691-7.
21. Yamada M, Johannesson B, Sagi I, Burnett LC, Kort DH, Prosser RW, Paull D, Nestor MW, Freeby M, Greenberg E, Goland RS, Leibel RL, Solomon SL,

- Benvenisty N, Sauer MV, Egli D. Human oocytes reprogram adult somatic nuclei of a type 1 diabetic to diploid pluripotent stem cells. *Nature*. 2014 Jun 26;510(7506):533-6.
22. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996;98:216-24.
  23. Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002;418:50-6.
  24. Rideout WM III, Hochedlinger K, Kyba M, Daley GQ, Jaenisch R. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell* 2002;109:17-27.
  25. Kfoury C. Therapeutic cloning: promises and issues. *MJM* 2007; 10(2):112-120.
  26. Körbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair – A new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003;349:570-82.
  27. Daley GQ, Goodell MA, Snyder EY. Realistic prospectos for stem cell therapeutics. *Hematology* 2003;1:398-418.
  28. Spradling A, Drummon-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature* 2001;414:122-8.
  29. Morris RJ, Liu Y, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S, Lin JS, Sawicki JA, Cotsarelis G. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol* 2004;22:411-7.
  30. Mina M, Braut A. New insight into progenitor/stem cells in dental pulp using Col 1a1-GFP transgenes. *Cells Tissues Organs* 2004;176 (1-3):120-33.
  31. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JL, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13(12):4279-95.
  32. Kajstura J, Rota M, Hall SR, Hosoda T, D'Amario d, Sanada F, Zheng H, Ogórek B, et al. Evidence for human lung stem cells. *N Engl J Med* 2011;364(19):1795-806.
  33. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000;290(5497):1775-9.
  34. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-9.
  35. Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN, Byrne BJ, Vaught T, Spoerri PE, Peck AB, Scott EW. Adult Hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002;8:607-12.
  36. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu D, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105:369-77.
  37. Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res* 2002;91:1092-102.
  38. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11-6.

39. Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloblastosis. *Hepatology* 2000;31:234-40.
40. Korbiling M, Ratz RL, Khanna A, Ruifrok AC, Rondon G, Albitar M, Champlin RE, Estrov Z. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002;346:738-746.
41. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003;9:702-12.
42. Shen JF, Sugawara A, Yamashita S, Orgura H, Sato S. Dedifferentiated fat cells: an alternative source of adult multipotent cells from the adipose tissues. *Int J Oral Sci* 2011; Jul 3(3):117-24.
43. Vassilopoulos G, Russell DW. Cell fusion: an alternative to stem cell plasticity and its therapeutic implications. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:480-485.
44. Jopling C, Boue S, Izpisua Belmonte JC. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12(2):79-89.
45. Spees JL, Olson SD, Ylostalo J, Lynch PJ, Smith J, Perry A, Peister A, Wang MY, Prockop DJ. Dedifferentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2397-2402.
46. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003;422:897-901.
47. Gibson AJ, Karasinski J, Relvas J, Moss J, Sherratt TG, Strong PN, Watt DJ.. Dermal fibroblasts convert to a myogenic lineage in mdx mouse muscle. *J Cell Sci* 1995;108 (Pt 1):207-214.
48. Weimann JM, Charlton CA, Brazelton TR, Hackman RC, Blau HM. Contributions of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc natl Acad Sci USA* 2003;100:2088-2093.
49. Weimann JM, Johansson CB, Trejo A, Blau HM. Stable reprogrammed heterokaryons from spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat Cell Biol* 2003;5:959-966.
50. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003;425:968–973.
51. Rizvi AZ, Swain JR, Davies PS, Bailey AS, Decker AD, Willenbring H, Grompe M, Fleming WH, Wong MH.. Bone marrow-derived cells fuse with normal and transformed intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:6321–6325.
52. Alvarez-Dolado M, Martínez-Losa M. Cell fusión and tissue regeneration. *Adv Exp Med Biol* 2011;713:161-75.
53. Jones L, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(1):11-21.
54. Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D.; Moorman, M. A.; Simonetti, D. W.; Craig, S.; Marshak, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 Apr;284(5411):143-147.
55. Friedenstein, A. J.; Deriglasova, U. F.; Kulagina, N. N.; Panasuk, A. F.; Rudakowa, S. F.; Luria, E. A.; Ruadkow, I. A. Precursors for fibroblasts in

- different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 1974;2(2):83-92.
56. Friedenstein, A. J.; Gorskaja, J. F.; Kulagina, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976 Sep;4(5):267-274.
  57. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7 (5):393-5.
  58. Takahashi K1, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006 Aug 25;126(4):663-76.
  59. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72.
  60. Zimmet H, Porapakham P, Porapakham P, Sata Y, Haas SJ, Itescu S, Forbes A, Krum H. Short- and long-term outcomes of intracoronary and endogenously mobilized bone marrow stem cells in the treatment of ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis of randomized control trials. *Eur J Heart Fail* 2012;14:91–105.
  61. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364:141–8.
  62. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bonemarrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355(12):1210-21.
  63. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Grøgaard HK, Bjørnerheim R, Brekke M, Müller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K.. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355:1199–209.
  64. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006;367:113–21.
  65. Roncalli J, Mouquet F, Piot C, Trochu JN, Le Corvoisier P, Neuder Y, Le Tourneau T, Agostini D, Gaxotte V, Sportouch C, Galinier M, Crochet D, Teiger E, Richard MJ, Polge AS, Beregi JP, Manrique A, Carrie D, Susen S, Klein B, Parini A, Lamirault G, Croisille P, Rouard H, Bourin P, Nguyen JM, Delasalle B, Vanzetto G, Van Belle E, Lemarchand P. Intracoronary autologous mononucleated bone marrow cell infusion for acute myocardial infarction: results of the randomized multicenter BONAMI trial. *Eur Heart J* 2011;32:1748–57.
  66. Hirsch A, Nijveldt R, van der Vleuten PA, Tijssen JG, van der Giessen WJ, Tio

- RA, Waltenberger J, ten Berg JM, Doevendans PA, Aengevaeren WR, Zwaginga JJ, Biemond BJ, van Rossum AC, Piek JJ, Zijlstra F; HEBE Investigators. Intracoronary infusion of mononuclear cells from bone marrow or peripheral blood compared with standard therapy in patients after acute myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention: results of the randomized controlled HEBE trial. *Eur Heart J* 2011;32:1736–47.
67. Perin EC, Willerson JT, Pepine CJ, Henry TD, Ellis SG, Zhao DX, Silva GV, Lai D, Thomas JD, Kronenberg MW, Martin AD, Anderson RD, Traverse JH, Penn MS, Anwaruddin S, Hatzopoulos AK, Gee AP, Taylor DA, Cogle CR, Smith D, Westbrook L, Chen J, Handberg E, Olson RE, Geither C, Bowman S, Francescon J, Baraniuk S, Piller LB, Simpson LM, Loghin C, Aguilar D, Richman S, Zierold C, Bettencourt J, Sayre SL, Vojvodic RW, Skarlatos SI, Gordon DJ, Ebert RF, Kwak M, Moyé LA, Simari RD; Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTRN). Effect of transendocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: the FOCUS-CCTRN trial. *JAMA* 2012; 307:1717–26.
  68. Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, Vilquin JT, Marolleau JP, Seymour B, Larghero J, Lake S, Chatellier G, Solomon S, Desnos M, Hagège AA.. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 2008, 117(9):1189-1200.
  69. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Pirr J, Rager U, Lippolt P, Hahn A, Fichtner S, Schaefer A, Arseniev L, Ganser A, Drexler H. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized-controlled BOOST trial. *Eur Heart J* 2009 Dec;30(24):2978-84.
  70. Hagège AA1, Marolleau JP, Vilquin JT, Alhérière A, Peyrard S, Duboc D, Abergel E, Messas E, Mousseaux E, Schwartz K, Desnos M, Menasché P. Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation* 2006, 114(1 Suppl):I108-113.
  71. Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, Jerzykowska O, Rzezniczak J, Rozwadowska N, Kurpisz M. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J* 2004, 148(3):531-537.
  72. Schächinger V, Assmus B, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; REPAIR-AMI investigators. Intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells abrogates adverse left ventricular remodelling post-acute myocardial infarction: insights from the reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodelling in acute myocardial infarction (REPAIR-AMI) trial. *Eur J Heart Fail* 2009, 11(10):973-979.
  73. Bartunek J, Behfar A, Dolatabadi D, Vanderheyden M, Ostojic M, Dens J, El Nakadi B, Banovic M, Beleslin B, Vrolix M, Legrand V, Vrints C, Vanoverschelde JL, Crespo-Diaz R, Homsey C, Tendera M, Waldman S, Wijns W, Terzic A. Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: the C-CURE (Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failure) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. *J Am Coll Cardiol* 2013;61: 2329–38.
  74. Hare JM1, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, Tracy M, Gherin E, Johnston PV, Brinker JA, Breton E, Davis-Sproul J, Schulman IH, Byrnes J, Mendizabal AM, Lowery MH, Rouy D, Altman



- P, Wong Po Foo C, Ruiz P, Amador A, Da Silva J, McNiece IK, Heldman AW, George R, Lardo A.. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA* 2012;308:2369–79.
75. Bolli R1, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, Beache GM, Wagner SG, Leri A, Hosoda T, Sanada F, Elmore JB, Goichberg P, Cappetta D, Solankhi NK, Fahsah I, Rokosh DG, Slaughter MS, Kajstura J, Anversa P. Cardiac Stem Cells in Patients with Ischaemic Cardiomyopathy (SCIPIO): initial re- sults of a randomised phase 1 trial. *Lancet* 2011;378:1847–57.
  76. Chugh AR1, Beache GM, Loughran JH, Mewton N, Elmore JB, Kajstura J, Pappas P, Tatroles A, Stoddard MF, Lima JA, Slaughter MS, Anversa P, Bolli R. Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance. *Circulation* 2012;126:S54–64.
  77. Makkar RR1, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, Czer LS, Marbán L, Mendizabal A, Johnston PV, Russell SD, Schuleri KH, Lardo AC, Gerstenblith G, Marbán E. Intracoronary Cardiosphere-Derived Cells for Heart Regeneration After Myocardial Infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet* 2012;379:895–904.
  78. Kawamura M1, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T, Kawamura T, Kuratani T, Daimon T, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell- derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model. *Circulation* 2012;126:S29–37.
  79. Chong JJ, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, Mahoney WM, Van Biber B, Palpant NJ, Gantz JA, Fugate JA, Muskheli V, Gough GM, Vogel KW, Astley CA, Hotchkiss CE, Baldessari A, Pabon L, Reinecke H, Gill EA, Nelson V, Kiem HP, Laflamme MA, Murry CE. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature*. 2014 Jun 12;510(7504):273-7.
  80. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, Taylor DA. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*. 2008 Feb;14(2):213-21.
  81. Lim SY1, Hernández D, Dusting GJ. Growing vascularized heart tissue from stem cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2013 Aug;62(2):122-9.
  82. Janson CG, Ramesh TM, During MJ, Leone P, Heywood J: Human intrathecal transplantation of peripheral blood stem cells in amyotrophic lateral sclerosis. *J Hematother Stem Cell Res* 2001, 10(6):913-915.
  83. Mazzini L, Ferrero I, Luparello V, Rustichelli D, Gunetti M, Mareschi K, Testa L, Stecco A, Tarletti R, Miglioretti M, et al: Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. *Exp Neurol* 2010, 223(1):229-37.
  84. Martinez HR, Gonzalez-Garza MT, Moreno-Cuevas JE, Caro E, Gutierrez-Jimenez E, Segura JJ: Stem-cell transplantation into the frontal motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Cytotherapy* 2009, 11(1):26-34.
  85. Papadeas ST, Maragakis NJ: Advances in stem cell research for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Opin Biotechnol* 2009, 20(5):545-551.

86. Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, et al: Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001, 344(10):710-719.
87. Hauser RA, Freeman TB, Snow BJ, Nauert M, Gauger L, Kordower JH, Olanow CW: Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson disease. *Arch Neurol* 1999, 56(2):179-187.
88. Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J, et al: A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003, 54(3):403-414.
89. Connick P, Kolappan M, Crawley C, Webber DJ, Patani R, Michell AW, Du MQ, Luan SL, Altmann DR, Thompson AJ, Compston A, Scott MA, Miller DH, Chandran S. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary pro-gressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *Lancet Neurol* 2012; 11: 150-156.
90. Zurita M, Vaquero J. Bone marrow stroma cells can achieve cure of chronic paraplegis rats: functional and morphological outcome one year after transplantation. *Neurosci Lett* 2006; 402:51-6.
91. Zurita M, Vaquero J, Bonilla C, Santos M, De Haro J, Oya S, Aguayo C. Functional recovery of chronic paraplegic pigs after autologous transplantation of bone marrow stromal cells. *Transplantation* 2008; 86: 845-853
92. Yoon SH, Shim YS, Park YH, Chung JK, Nam JH, Kim MO, Park HC, Park SR, Min BH, Kim EY, et al: Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial. *Stem Cells* 2007, 25(8):2066-2073.
93. Kalladka D, Muir KW. Brain repair: cell therapy in stroke. *Stem Cells Cloning* 2014 Feb 21;7:31-44.
94. Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G: Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol* 2005, 57(6):874-882.
95. Islam MN, Das SR, Emin MT, Wei M, Sun L, Westphalen K, Rowlands DJ, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat Med* 2012; 18: 759-65.
96. Zhu YG, Feng XM, Abbott J, Fang XH, Hao Q, Monsel A, Qu JM, Matthay MA, Lee JW. Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of Escherichia Coli endotoxin-induced acute lung injury in mice. *Stem Cells* 2014; 32:116-25.
97. Rojas M, Xu J, Woods CR et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33:145-52.
98. Moodley Y, Atienza D, Manuelpillai U, Samuel CS, Tchongue J, Ilancheran S, Boyd R, Trounson A. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce fibrosis of bleomycin-induced lung injury. *Am J Pathol.* 2009 Jul;175(1):303-13.
99. Lee SH, Jang AS, Kim YE, Cha JY, Kim TH, Jung S, Park SK, Lee YK, Won JH, Kim YH, Park CS. Modulation of cytokine and nitric oxide by mesenchymal stem cell transfer in lung injury/fibrosis. *Respir Res* 2010 Feb 8; 11:16.
100. Zhen G, Xue Z, Zhao J, Gu N, Tang Z, Xu Y, Zhang Z. Mesenchymal stem cell transplantation increases expression of vascular endothelial growth factor in papain-induced emphysematous lungs and inhibits apoptosis of lung

- cells. *Cytotherapy*. 2010 Sep;12(5):605-14.
101. Grove DA, Xu J, Joodi R, Torres-Gonzales E, Neujahr D, Mora AL, Rojas M. Attenuation of early airway obstruction by mesenchymal stem cells in a murine model of heterotopic tracheal transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2011 Mar;30(3):341-50.
  102. Mei SH, Haitsma J, Dos Santos CC, Deng Y, Lai PF, Slutsky AS, Liles WC, Stewart DJ. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Oct 15;182(8):1047-57.
  103. Matthay MA; Goolaerts A, Howard JP, Lee JW. Mesenchymal stem cells for acute lung injury: preclinical evidence. *Crit Care Med*. 2010 Oct; 38(10 Suppl):S569-73.
  104. Kajstura J, Rota M, Hall SR, Hosoda T, et al. Evidence for human lung stem cells. *N Engl J Med* 2011; 364(19):1795-806.
  105. Andrade CF, Wong AP, Waddell TK, Keshavjee S, Liu M. Cell-based tissue engineering for lung regeneration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292:L510-L518.
  106. Petersen TH, Calle EA, Zhao L, et al. Tissue-Engineered Lung for in vivo implantation. *Science* 2010; 329(5991):538-41.
  107. Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 2008; 372 (9655):2023-30.
  108. Gonfiotti A, Jaus MO, Barale D, Baiguera S, Comin C, Lavorini F, Fontana G, Sibila O, Rombolà G, Jungebluth P, Macchiarini P. The first tissue-engineered airway transplantation: 5-year follow-up results. *Lancet*. 2014 Jan 18;383(9913):238-44.
  109. Weiss DJ, Casaburi R, Flannery R, LeRoux-Williams M, Tashkin DP. A placebo-controlled randomized trial of mesenchymal stem cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Chest*. 2013 Jun;143(6):1590-8.
  110. Gangji V, Hauzeur JP, Matos C, et al. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrowcells—a pilot study. *J Bone Joint Surg—American Volume* 2004; 86A:1153–60.
  111. Ushiku C, Adams DJ, Jiang X, Wang L, Rowe DW. Long bone fracture repair in mice harboring GFP reporters for cells within the osteoblastic lineage. *J Orthop Res*. 2010 Oct;28(10):1338-47.
  112. Schraufstatter IU, Discipio RG, Khaldoyanidi S. Mesenchymal stem cells and their microenvironment. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011 Jun 1;16:2271-88.
  113. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, et al. Isolated allogeneic bone marrow- derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8932–7.
  114. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999;5:309–13.
  115. Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin Orthop* 2002:14–23.
  116. Jones KB, Seshadri T, Krantz R, et al. Cell-based therapies for osteonecrosis of the femoral head. *Biol Blood Marrow Transplant*

- 2008;14:1081–7.
117. Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, et al. Stem cells associated with macro- porous bioceramics for long bone repair: 6-to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng* 2007;13:947–55.
  118. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001;344:385–6.
  119. Falanga V, Iwamoto S, Chartier M et al. Autologous bone marrow derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng* 2007;13:1299–1312.
  120. Oh YH. Use of adipose-derived stem cells (ADSCs) treatment in rhinoplasty: abstract book of aesthetic plastic surgery. Seoul: EXCO, 2013, 60.
  121. Jeong JH. Clinical stem cell therapy in plastic surgery: abstract book of aesthetic plastic surgery. Seoul: EXCO, 2013, 61.
  122. Badiavas AR, Badiavas EV. Potencial benefits of allogenic bone marrow mesenchymal stem cells for wound healing. *Expert Opin Biol Ther* 2001; 11(11): 1447-54.
  123. Yi T, Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res* 2012 Feb; 35(2):213-21.
  124. Gómez de Antonio D, Zurita M, Santos M, Salas I, Vaquero J, Varela A. Stem cells and bronchial stump healing. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010; 140 (6): 1397-1401.
  125. Petrella F, Toffalorio F, Brizzola S, De Pas TM, Rizzo S, Barberis M, Pellici P, Spaggiari L, Acocella F. Stem cell transplantation effectively occludes bronchopleural fistula in an animal model. *Ann Thorac Surg* 2014 Feb; 97(2):480-3.
  126. Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, Oliveira MC, Moraes DA, Pieroni F, Coutinho M, Malmegrim KC, Foss-Freitas MC, Simoes BP, et al: Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA* 2007, 297(14):1568-1576.
  127. Snarski E, Torosian T, Paluszewska M, Urbanowska E, Milczarczyk A, Jedynasty K, Franek E, Jedrzejczak WW: Alleviation of exogenous insulin requirement in type 1 diabetes mellitus after immunoablation and transplantation of autologous hematopoietic stem cells. *Pol Arch Med Wewn* 2009, 119(6):422-426.
  128. Trivedi HL, Vanikar AV, Thakker U, Firoze A, Dave SD, Patel CN, Patel JV, Bhargava AB, Shankar V: Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells combined with hematopoietic stem cell transplantation synthesize insulin. *Transplant Proc* 2008, 40(4):1135-1139.
  129. Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front Immunol* 2013, Sep 4;4:201.
  130. Orens J, Estenne M, Arcasoy S, Conte J, Corris P, Egan J, Egan T, Keshavjee S, Knoop C, Kotloff R, Martinez F, Nathan S, Palmer S, Patterson A, Singer L, Snell G, Studer S, Vachieri J, Glanville A. International Guidelines for the Selection of Lung Trasplant Candidates: 2006 Update- A Consensus Report From the Pulmonary Scientific Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation.
  131. Yusen RD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, Goldfarb SB, Levvey BJ, Lund LH, Meiser B, Stehlik J. The registry

- of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first adult lung and heart-lung transplant report--2014; focus theme: retransplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2014 Oct;33(10):1009-24.
132. Levvey BJ, Harkess M, Hopkins P, Chambers D, Merry C, Glanville a. R, et al. Excellent Clinical Outcomes From a National Donation-After-Determination-of-Cardiac-Death Lung Transplant Collaborative. *Am J Transplant* 2012;12:2406–13.
  133. Cypel M, Levvey B, Van Raemdonck D, Erasmus M, Love R, Mason D, et al. Favorable Outcomes of Donation after Cardiac Death in Lung Transplantation: A Multicenter Study. *J Hear Lung Transplant* 2013;32(4):S15.
  134. Campo-Cañaveral de la Cruz JL, Gómez de Antonio D, Hoyos-Mejía L, Pérez-Redondo M, Laporta-Hernández R, Varela de Ugarte A. Controlled non-heart beating donor lung transplantation: Initial experience in Spain. *Arch Bronconeumol*. 2015 Jun 26. Epub ahead of print.
  135. Gómez de Antonio D, Campo-Cañaveral JL, Crowley S, Valdivia D, Córdoba M, Moradiellos J, Naranjo JM, Ussetti P, Varela A. Clinical lung Transplantation from uncontrolled non-heart-beating donors revisited. *J Heart Lung Transplat* 2012 Apr;31(4):349-53.
  136. Cypel M, Yeung JC, Liu M, Anraku M, Chen F, Karolak W, Sato M, Laratta J, Azad S, Madonik M, Chow CW, Chaparro C, Hutcheon M, Singer L, Slutsky AS, Yasufuku K, de Perrot M, Pierre AF, Waddell TK, Keshavjee S. Normothermic ex vivo lung perfusion in clinical lung transplantation. *N Engl J Med* 2011; 364:1431-40.
  137. Cooper JD, Billingham M, Egan T, et al. A working formulation for the standardization of nomenclature for clinical staging of chronic dysfunction in lung allografts. *J Heart Lung Transplant* 1993; 12:713.
  138. Yousem SA. Lymphocytic bronchitis/bronchiolitis in lung allograft recipients. *Am J Surg Pathol* 1993; 17:491.
  139. Yousem SA, Duncan SR, Griffith BP. Interstitial and airspace granulation tissue reactions in lung transplant recipients. *Am J Surg Pathol* 1992; 16:877-84.
  140. Kramer MR, Stoehr C, Wang JL, et al. The diagnosis of obliterative bronchiolitis after heart-lung and lung transplantation: low yield of transbronchial biopsies. *J Heart Lung Transplant* 1993; 12:675.
  141. Estenne M, Maurer JR, Boehler A, Egan JJ, Frost A, Hertz M, Mallory GB, Snell GI, Yousem S. Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21:297-310.
  142. Lama VN, Murray S, Lonigro RJ, Toews GB, Chang A, Lau C, Flint A, Chan KM, Martinez FJ. Course of FEV(1) after onset of bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:1192-8.
  143. de Jong PA, Dodd JD, Coxson HO, Storness-Bliss C, Paré PD, Mayo JR, Levy RD. Bronchiolitis obliterans following lung transplantation: early detection using computed tomographic scanning. *Thorax* 2006; 61:799-804.
  144. Bankier AA, Van Muylem A, Knoop C, Estenne M, Gevenois PA. Bronchiolitis obliterans syndrome in heart-lung transplant recipients: diagnosis with expiratory CT. *Radiology* 2001; 218:533-9.
  145. Glanville AR. Bronchoscopic monitoring after lung transplantation. *Semin Respir Crit Care Med* 2010;31:208-21.

146. Sato M, Waddell TK, Wagnetz U, Roberts HC, Hwang DM, Haroon A, et al. Restrictive allograft syndrome (RAS): a novel form of chronic lung allograft dysfunction. *J Heart Lung Transplant* 2011 Jul;30(7):735–42.
147. Verleden GM, Vos R, Verleden SE, De Wever W, De Vleeschauwer SI, Willems-Widyastuti A, et al. Survival determinants in lung transplant patients with chronic allograft dysfunction. *Transplantation* 2011 Sep 27;92(6):703–8.
148. Ofek E, Sato M, Saito T, Wagnetz U, Roberts HC, Chaparro C, et al. Restrictive allograft syndrome post lung transplantation is characterized by pleuroparenchymal fibroelastosis. *Mod Pathol* 2013 Mar;26(3):350–6.
149. Gottlieb J, Szangolies J, Koehnlein T, Golpon H, Simon A, Welte T. Long-term azithromycin for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplantation* 2008 Jan 15;85(1):36–41.
150. Vos R, Vanaudenaerde BM, Ottevaere A, Verleden SE, De Vleeschauwer SI, Willems-Widyastuti A, et al. Long-term azithromycin therapy for bronchiolitis obliterans syndrome: divide and conquer? *J Heart Lung Transplant*. 2010 Dec;29(12):1358–68.
151. Vos R, Vanaudenaerde BM, Verleden SE, De Vleeschauwer SI, Willems-Widyastuti A, Van Raemdonck DE, et al. A randomised controlled trial of azithromycin to prevent chronic rejection after lung transplantation. *Eur Respir J* 2011 Jan;37(1):164–72.
152. Suwara MI, Vanaudenaerde BM, Verleden SE, Vos R, Green NJ, Ward C, Borthwick LA, Vandermeulen E, Lordan J, Van Raemdonck DE, Corris PA, Verleden GM, Fisher AJ. Mechanistic differences between phenotypes of chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation. *Transpl Int*. 2014 Aug;27(8):857-67.
153. Brugière O, Pessione F, Thabut G, Mal H, Jebrak G, Lesèche G, et al. Bronchiolitis obliterans syndrome after single-lung transplantation: impact of time to onset on functional pattern and survival. *Chest* 2002 Jun;121(6):1883–9.
154. Burton CM, Carlsen J, Mortensen J, Andersen CB, Milman N, Iversen M. Long-term survival after lung transplantation depends on development and severity of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant* 2007 Jul;26(7):681–6.
155. Jackson CH, Sharples LD, McNeil K, Stewart S, Wallwork J. Acute and chronic onset of bronchiolitis obliterans syndrome (BOS): are they different entities? *J Heart Lung Transplant* 2002 Jun;21(6):658–66.
156. Lama VN, Murray S, Lonigro RJ, Toews GB, Chang A, Lau C, et al. Course of FEV(1) after onset of bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med* 2007 Jun 1;175(11):1192–8.
157. Nathan SD, Ross DJ, Belman MJ, Shain S, Elashoff JD, Kass RM, et al. Bronchiolitis obliterans in single-lung transplant recipients. *Chest* 1995 Apr;107(4):967–72.
158. Meyer KC, Raghu G, Verleden GM, Corris P a, Aurora P, Wilson KC, et al. An international ISHLT / ATS / ERS clinical practice guideline: diagnosis and management of bronchiolitis obliterans syndrome. 2014;1479–503.
159. Heng D, Sharples LD, McNeil K, Stewart S, Wreghitt T, Wallwork J. Bronchiolitis obliterans syndrome: incidence, natural history, prognosis, and risk factors. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17:1255-63.
160. Girgis RE, Tu I, Berry GJ, Reichenspurner H, Valentine VG, Conte JV, Ting A, Johnstone I, Miller J, Robbins RC, Reitz BA, Theodore J. Risk factors

- for the development of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15:1200-8.
161. Kroshus TJ, Kshetry VR, Savik K, John R, Hertz MI, Bolman RM 3rd. Risk factors for the development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 114:195-202.
  162. Husain AN, Siddiqui MT, Holmes EW, Chandrasekhar AJ, McCabe M, Radvany R, Garrity ER. Analysis of risk factors for the development of bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:829-33.
  163. Sharples LD, McNeil K, Stewart S, Wallwork J. Risk factors for bronchiolitis obliterans: a systematic review of recent publications. *J Heart Lung Transplant* 2002;21:271-81.
  164. Khalifah AP, Hachem RR, Chakinala MM, Schechtman KB, Patterson GA, Schuster DP, Mohanakumar T, Trulock EP, Walter MJ. Respiratory viral infections are a distinct risk for bronchiolitis obliterans syndrome and death. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:181-7.
  165. Corris PA. Lung transplantation. Bronchiolitis obliterans syndrome. *Chest Surg Clin N Am* 2003;13:543-57.
  166. Bando K, Paradis IL, Similo S, et al. Obliterative bronchiolitis after lung and heart-lung transplantation. An analysis of risk factors and management. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995; 110 (1): 4 - 13 .
  167. Scott AI, Sharples LD, Stewart S. Bronchiolitis obliterans syndrome: risk factors and therapeutic strategies. *Drugs*. 2005; 65 (6): 761-771.
  168. Hachem RR, Khalifah AP, Chakinala MM, Yusef RD, Aloush AA, Mohanakumar T, Patterson GA, Trulock EP, Walter MJ. The significance of a single episode of minimal acute rejection after lung transplantation. *Transplantation* 2005;80:1406-13.
  169. Glanville AR, Aboyoun CL, Havryk A, Plit M, Rainer S, Malouf MA. Severity of lymphocytic bronchiolitis predicts long-term outcome after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2008 May 1;177(9):1033-40.
  170. Ross DJ, Marchevsky A, Kramer M, Kass RM. "Refractoriness" of airflow obstruction associated with isolated lymphocytic bronchiolitis/bronchitis in pulmonary allografts. *J Heart Lung Transplant* 1997 Aug;16(8):832-8.
  171. Schulman LL, Weinberg AD, McGregor C, Galantowicz ME, Suciu-Foca NM, Itescu S. Mismatches at the HLA-DR and HLA-B loci are risk factors for acute rejection after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1833-7.
  172. van den Berg JW, Hepkema BG, Geertsma A, Koëter GH, Postma DS, de Boer WJ, Lems SP, van der Bij W. Long-term outcome of lung transplantation is predicted by the number of HLA-DR mismatches. *Transplantation* 2001; 71:368-73.
  173. SivaSai KS, Smith MA, Poindexter NJ, et al: Indirect recognition of donor HLA class I peptides in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 1999; 67:1094-1098.
  174. Lu KC, Jaramillo A, Mendeloff EN, et al: Concomitant allorecognition of mismatched donor HLA class I- and class II-derived peptides in pediatric lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant* 2003; 22:35-43.

175. Reznik SI, Jaramillo A, SivaSai KS, et al: Indirect allorecognition of mismatched donor HLA class II peptides in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Transplant* 2001; 1:228-235.
176. Sundaresan S, Mohanakumar T, Smith MA, et al. HLA-A locus mismatches and development of antibodies to HLA after lung transplantation correlate with the development of bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 1998; 65:648-653.
177. Smith MA, Sundaresan S, Mohanakumar T, et al. Effect of development of antibodies to HLA and cytomegalovirus mismatch on lung transplantation survival and development of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 116:812-820.
178. Jaramillo A, Smith MA, Phelan D, et al. Development of ELISA-detected anti-HLA antibodies precedes the development of bronchiolitis obliterans syndrome and correlates with progressive decline in pulmonary function after lung transplantation. *Transplantation* 1999; 67:1155-1161.
179. Palmer SM, Davis RD, Hadjiliadis D, et al. Development of an antibody specific to major histocompatibility antigens detectable by flow cytometry after lung transplant is associated with bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 2002; 74:799-804.
180. Jaramillo A, Smith CR, Maruyama T, et al. Anti-HLA class I antibody binding to airway epithelial cells induces production of fibrogenic growth factors and apoptotic cell death: a possible mechanism for bronchiolitis obliterans syndrome. *Hum Immunol* 2003; 64:521-529.
181. Yasufuku K, Heidler KM, Woods KA, et al. Prevention of bronchiolitis obliterans in rat lung allografts by type V collagen-induced oral tolerance. *Transplantation* 2002; 73:500-505.
182. Sumpter TL, Wilkes DS. Role of autoimmunity in organ allograft rejection: a focus on immunity to type V collagen in the pathogenesis of lung transplant rejection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286:L1129-39.
183. Burlingham WJ, Love RB, Jankowska-Gan E, et al. IL-17-dependent cellular immunity to collagen type V predisposes to obliterative bronchiolitis in human lung transplants. *J Clin Invest* 2007; 117:3498-3506.
184. Goers TA, Ramachandran S, Aloush A, et al. De novo production of K- $\alpha$ 1 tubulin-specific antibodies: role in chronic lung allograft rejection. *J Immunol* 2008; 180:4487-4494.
185. Andrade CF, Waddell TK, Keshavjee S, et al. Innate immunity and organ transplantation: the potential role of toll-like receptors. *Am J Transplant* 2005; 5:969-975.
186. Laan M, Cui ZH, Hoshino H, et al. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol* 1999; 162:2347-2352.
187. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:490-511.
188. Fiser SM, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Kern JA, Jones DR, Robbins MK, Kron IL. Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation increases risk of late bronchiolitis obliterans syndrome. *Ann Thorac Surg* 2002; 73:1041-7.
189. Whitson BA, Prekker ME, Herrington CS, Whelan TP, Radosevich DM, Hertz MI, Dahlberg PS. Primary graft dysfunction and long-term pulmonary function after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2007; 26:1004-11.



190. Daud SA, Yusen RD, Meyers BF, Chakinala MM, Walter MJ, Aloush AA, Patterson GA, Trulock EP, Hachem RR. Impact of immediate primary lung allograft dysfunction on bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:507-13.
191. Weigt SS, Elashoff RM, Keane MP, et al. Altered levels of CC chemokines during pulmonary CMV predict BOS and mortality post-lung transplantation. *Am J Transplant* 2008;8:1512-1522.
192. Keenan RJ, Lega ME, Dummer JS, Paradis IL, Dauber JH, Rabinowich H, Yousem SA, Hardesty RL, Griffith BP, Duquesnoy RJ, Zeevi A. Cytomegalovirus serologic status and postoperative infection correlated with risk of developing chronic rejection after pulmonary transplantation. *Transplantation* 1991;51:433-8.
193. Smith MA, Sundaresan S, Mohanakumar T, Trulock EP, Lynch JP, Phelan DL, et al. Effect of development of antibodies to HLA and cytomegalovirus mismatch on lung transplantation survival and development of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 116:812–820.
194. Boehler A, Kesten S, Weder W, Speich R. Bronchiolitis obliterans after lung transplantation: a review. *Chest* 1998;114:1411-26.
195. Luckraz H, Sharples L, McNeil K, Wreghitt T, Wallwork J. Cytomegalovirus antibody status of donor/recipient does not influence the incidence of bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2003; 22(3):287-91.
196. Tamm M, Aboyoun CL, Chhajed PN, Rainer S, Malouf MA, Glanville AR. Treated cytomegalovirus pneumonia is not associated with bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:1120-3.
197. Engelmann I, Welte T, Fühner T, Simon AR, Mattner F, Hoy L, Schulz TF, Gottlieb J. Detection of Epstein-Barr virus DNA in peripheral blood is associated with the development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J Clin Virol* 2009;45:47-53.
198. Neurohr C, Huppmann P, Leuchte H, Schwaiblmair M, Bittmann I, Jaeger G, Hatz R, Frey L, Uberfuhr P, Reichart B, Behr J, Munich Lung Transplant Group Human herpesvirus 6 in bronchialveolar lavage fluid after lung transplantation: a risk factor for bronchiolitis obliterans syndrome? *Am J Transplant*. 2005 Dec;5(12):2982-91.
199. Blondeau K, Mertens V, Vanaudenaerde BA, Verleden GM, Van Raemdonck DE, Sifrim D, Dupont LJ. Gastro-oesophageal reflux and gastric aspiration in lung transplant patients with or without chronic rejection. *Eur Respir J* 2008;31:707-13.
200. D'Ovidio F, Mura M, Tsang M, Waddell TK, Hutcheon MA, Singer LG, Hadjiliadis D, Chaparro C, Gutierrez C, Pierre A, Darling G, Liu M, Keshavjee S. Bile acid aspiration and the development of bronchiolitis obliterans after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;129:1144-52.
201. Davis RD Jr, Lau CL, Eubanks S, Messier RH, Hadjiliadis D, Steele MP, Palmer SM. Improved lung allograft function after fundoplication in patients with gastroesophageal reflux disease undergoing lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125:533-42.
202. Cantu E 3rd, Appel JZ 3rd, Hartwig MG, Woreta H, Green C, Messier R, Palmer SM, Davis RD Jr. J. Maxwell Chamberlain Memorial Paper. Early

- fundoplication prevents chronic allograft dysfunction in patients with gastroesophageal reflux disease. *Ann Thorac Surg* 2004;78:1142-51.
203. Valentine VG, Gupta MR, Walker JE Jr, Seoane L, Bonvillain RW, Lombard GA, Weill D, Dhillon GS. Effect of etiology and timing of respiratory tract infections on development of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant* 2009;28:163-9.
  204. Kotsimbos TC, Snell GI, Levvey B, Spelman DW, Fuller AJ, Wesselingh SL, Williams TJ, Ostergaard L. Chlamydia pneumoniae serology in donors and recipients and the risk of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplantation* 2005;79:269-75.
  205. Weigt SS, Elashoff RM, Huang C, Ardehali A, Gregson AL, Kubak B, Fishbein MC, Saggarr R, Keane MP, Saggarr R, Lynch JP 3rd, Zisman DA, Ross DJ, Belperio JA. Aspergillus Colonization of the Lung Allograft Is a Risk Factor for Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *Am J Transplant* 2009;9:1903-11.
  206. Hadjiliadis D, Chaparro C, Gutierrez C, Steele MP, Singer LG, Davis RD, Waddell TK, Hutcheon MA, Palmer SM, Keshavjee S. Impact of lung transplant operation on bronchiolitis obliterans syndrome in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Transplant* 2006;6:183-9.
  207. Christie JD, Edwards LB, Aurora P, et al. The registry of the international society for heart and lung transplantation: twenty-sixth official adult lung and heart-lung transplantation Report-2009. *J Heart Lung Transplant* 2009;28:1031-1049.
  208. Cai J, Terasaki PI. Induction immunosuppression improves long-term graft and patient outcome in organ transplantation: an analysis of United Network for Organ Sharing registry data. *Transplantation* 2010 Dec 27;90(12):1511-5.
  209. Shyu S, Dew MA, Pilewski JM, DeVito Dabbs AJ, Zaldonis DB, Studer SM, et al. Five-year outcomes with alemtuzumab induction after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2011 Jul;30(7):743-54.
  210. Reams BD, Musselwhite LW, Zaas DW, Steele MP, Garantziotis S, Eu PC, et al. Alemtuzumab in the treatment of refractory acute rejection and bronchiolitis obliterans syndrome after human lung transplantation. *Am J Transplant* 2007 Dec;7(12):2802-8.
  211. Keenan RJ, Konishi H, Kawai A, et al: Clinical trial of tacrolimus versus cyclosporine in lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:580-584; discussion 584-585.
  212. Cairn J, Yek T, Banner NR, Khaghani A, Hodson ME, Yacoub M. Time-related changes in pulmonary function after conversion to tacrolimus in bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant* 2003;22:50-7.
  213. Whyte RI, Rossi SJ, Mulligan MS, Florn R, Baker L, Gupta S, Martinez FJ, Lynch JP 3rd. Mycophenolate mofetil for obliterative bronchiolitis syndrome after lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 1997;64:945-8.
  214. McNeil K, Glanville AR, Wahlers T, et al: Comparison of mycophenolate mofetil and azathioprine for prevention of bronchiolitis obliterans syndrome in de novo lung transplant recipients. *Transplantation* 2006; 81:998-1003.
  215. Villaneuva J, Boukhamseen A, Bhorade S. Successful use in lung transplantation of an immunosuppressive regimen aimed at reducing target blood levels of sirolimus and tacrolimus. *J Heart Lung Transplant* 2004; 24:421-5.

216. Hernandez R, Ussetti P, Garcia Gallo C, de Pablo Gafas A, Carreno Hernandez MC, Ferreira Alvarez MJ. Rapamycin in lung transplantation. *Transplant Proc* 2005;37:3999–4000.
217. Groetzner J, Wittwer T, Kaczmarek I, et al: Conversion to sirolimus and mycophenolate can attenuate the progression of bronchiolitis obliterans syndrome and improves renal function after lung transplantation. *Transplantation* 2006; 81:355-360.
218. Snell GI, Valentine VG, Vitulo P, Glanville AR, McGiffin DC, Loyd JE, Roman A, Aris R, Sole A, Hmissi A, Pirron U; RAD B159 Study Group. Everolimus versus azathioprine in maintenance lung transplant recipients: an international, randomized, double-blind clinical trial. *Am J Transplant*. 2006 Jan;6(1):169-77.
219. Iacono AT, Johnson BA, Grgurich WF, Youssef JG, Corcoran TE, Seiler DA, Dauber JH, Smaldone GC, Zeevi A, Yousem SA, Fung JJ, Burckart GJ, McCurry KR, Griffith BP. A randomized trial of inhaled cyclosporine in lung-transplant recipients. *N Engl J Med* 2006;354:141-50.
220. Groves S, Galazka M, Johnson B, Corcoran T, Verceles A, Britt E, Todd N, Griffith B, Smaldone GC, Iacono A. Inhaled cyclosporine and pulmonary function in lung transplant recipients. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2010;23:31-9.
221. Hayes D Jr, Zwischenberger JB, Mansour HM. Aerosolized tacrolimus: a case report in a lung transplant recipient. *Transplant Proc* 2010;42:3876-9.
222. Verleden GM, Vanaudenaerde BM, Dupont LJ, et al: Azithromycin reduces airway neutrophilia and interleukin-8 in patients with bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:566-570.
223. Jain R, Hachem RR, Morrell MR, Trulock EP, Chakinala MM, Yusem RD, Huang HJ, Mohanakumar T, Patterson GA, Walter MJ. Azithromycin is associated with increased survival in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant* 2010;29:531-7.
224. Johnson BA, Iacono AT, Zeevi A, et al: Statin use is associated with improved function and survival of lung allografts. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:1271-1278.
225. Benden C, Speich R, Hofbauer GF, Irani S, Eich-Wanger C, Russi EW, Weder W, Boehler A. Extracorporeal photopheresis after lung transplantation: a 10-year single-center experience. *Transplantation* 2008;86:1625-7.
226. Morrell MR, Despotis GJ, Lublin DM, Patterson GA, Trulock EP, Hachem RR. The efficacy of photopheresis for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2010;29:424-31.
227. Kawut SM, Lederer DJ, Keshavjee S, Wilt JS, Daly T, D'Ovidio F, Sonett JR, Arcasoy SM, Barr ML. Outcomes after lung retransplantation in the modern era. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177(1):114-20.
228. Kawut SM, Lederer DJ, Keshavjee S, Wilt JS, Daly T, D'Ovidio F, Sonett JR, Arcasoy SM, Barr ML. Outcomes after lung retransplantation in the modern era. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177(1):114-20.
229. Brugière O, Thabut G, Castier Y, Mal H, Dauriat G, Marceau A, Lesèche G. Lung retransplantation for bronchiolitis obliterans syndrome: long-term follow-up in a series of 15 recipients. *Chest* 2003;123:1832-7.
230. Martinu T, Howell DN, Davis RD, Steele MP, Palmer SM. Pathologic correlates of bronchiolitis obliterans syndrome in pulmonary retransplant recipients. *Chest* 2006;129:1016-23.

231. Strueber M, Fischer S, Gottlieb J, Simon AR, Goerler H, Gohrbandt B, Welte T, Haverich A. Long-term outcome after pulmonary retransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;132:407-12.
232. Aigner C, Jaksch P, Taghavi S, Lang G, Reza-Hoda MA, Wisser W, Klepetko W. Pulmonary retransplantation: is it worth the effort? A long-term analysis of 46 cases. *J Heart Lung Transplant* 2008;27:60-5.
233. Osaki S, Maloney JD, Meyer KC, Cornwell RD, Edwards NM, De Oliveira NC. Redo lung transplantation for acute and chronic lung allograft failure: long-term follow-up in a single center. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008;34:1191-7.
234. Sumpter TL, Wilkes DS. Role of autoimmunity in organ allograft rejection: A focus on immunity to type V collagen in the pathogenesis of lung transplant rejection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286: L1129–L1139.
235. Burlingham WJ, Love RB, Jankowska-Gan E et al. IL-17-dependent cellular immunity to collagen type V predisposes to obliterative bronchiolitis in human lung transplants. *J Clin Invest* 2007; 117:3498–3506.
236. Li B, Hartwig MG, Appel JZ et al. Chronic aspiration of gastric fluid induces the development of obliterative bronchiolitis in rat lung transplants. *Am J Transplant* 2008; 8: 1614–1621.
237. Zweers N, Petersen AH, Van Der Hoeven JA et al. Donor brain death aggravates chronic rejection after lung transplantation in rats. *Transplantation* 2004; 78: 1251–1258.
238. Jungraithmayr W, Vogt P, Inci I, Hillinger S, Arni S, Korom S, Weder W. A model of chronic lung allograft rejection in the rat. *Eur Respir J* 2010; 35: 1354-1363.
239. Hammainen PT. Single lung transplantation in piglets. Technique and follow up. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg*. 1993; 27(2): 71-80.
240. Allan JS, Wain JC, Schwarze ML et al. Modeling chronic lung allograft rejection in miniature swine. *Transplantation* 2002; 73:447–453.
241. Hertz MI, Jessurun J, King MB, Savik SK, Murray JJ. Reproduction of the obliterative bronchiolitis lesion after heterotopic transplantation of mouse airways. *Am J Pathol* 1993 Jun;142(6):1945–51.
242. Boehler A, Chamberlain D, Kesten S, Slutsky AS, Liu M, Keshavjee S. Lymphocytic airway infiltration as a precursor to fibrous obliteration in a rat model of bronchiolitis obliterans. *Transplantation* 1997 Jul 27;64(2):311–7.
243. Dutly AE, Andrade CF, Verkaik R et al. A novel model for post-transplant obliterative airway disease reveals angiogenesis from the pulmonary circulation. *Am J Transplant* 2005; 5: 248– 254.
244. Wagnetz D, Sato M, Hirayama S et al. The mouse intrapulmonary tracheal transplant model of obliterative bronchiolitis: A novel tool to investigate lymphoid neogenesis in the lung after transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2009; 28: S247.
245. Casey A, Dirks F, Liang OD, Harrach H, Schuette-nuetgen K, Leeman K, et al. Bone Marrow-Derived Multipotent Stromal Cells Attenuate Inflammation in Obliterative Airway Disease in Mouse Tracheal Allografts. *Stem Cells Int*. 2014;2014:468927.
246. Sato M, Liu M, Anraku M et al. Allograft airway fibrosis in the pulmonary milieu: A disorder of tissue remodeling. *Am J Transplant* 2008; 8: 517–528.
247. Gómez-de-Antonio D, Campo-Cañaveral de la Cruz JL, Gonzalez-Lois C, Santos M, Millán I, Varela de Ugarte A. Heterotopic tracheal transplantation

- animal model of bronchiolitis obliterans: A reproducible model. *Ann Transplant* 2013;18:661–70.
248. BOE nº 252, 21 de octubre del 2005, páginas 34367-34391.
249. De Vleeschauwer S, Jungraithmayr W, Wauters S, Willems S, Rinaldi M, Vaneylen A, et al. Chronic Rejection Pathology after Orthotopic Lung Transplantation in Mice: The Development of a Murine BOS Model and Its Drawbacks. Gregson A, editor. *PLoS One* 2012 Jan 6;7(1):e29802.
250. Hirt SW, You XM, Möller F, Boeke K, Starke M, Spranger U, et al. Development of obliterative bronchiolitis after allogeneic rat lung transplantation: implication of acute rejection and the time point of treatment. *J Heart Lung Transplant*. 1999 Jun;18(6):542–8.
251. Mizobuchi T, Yasufuku K, Zheng Y, Haque MA, Heidler KM, Woods K, et al. Differential expression of Smad7 transcripts identifies the CD4+CD45RChigh regulatory T cells that mediate type V collagen-induced tolerance to lung allografts. *J Immunol*. 2003 Aug 1;171(3):1140–7.
252. Matsumura Y, Marchevsky A, Zuo XJ, Kass RM, Matloff JM, Jordan SC. Assessment of pathological changes associated with chronic allograft rejection and tolerance in two experimental models of rat lung transplantation. *Transplantation*. 1995 Jun 15;59(11):1509–17.
253. Zweers N, Petersen AH, van der Hoeven JAB, de Haan A, Ploeg RJ, de Leij LFMH, et al. Donor brain death aggravates chronic rejection after lung transplantation in rats. *Transplantation*. 2004 Nov 15;78(9):1251–8.
254. Hirschburger M, Greschus S, Kuchenbuch T, Plötz C, Obert M, Traupe H, et al. Lung transplantation in the Fischer 344-->Wistar Kyoto rat strain combination is not suitable to study bronchiolitis obliterans. *J Heart Lung Transplant*. 2007 Apr;26(4):390–8.
255. Ikonen TS, Brazelton TR, Berry GJ, Shorthouse RS, Morris RE. Epithelial re-growth is associated with inhibition of obliterative airway disease in orthotopic tracheal allografts in non-immunosuppressed rats. *Transplantation*. 2000 Sep 27;70(6):857–63.
256. Genden EM, Boros P, Liu J, Bromberg JS, Mayer L. Orthotopic tracheal transplantation in the murine model. *Transplantation*. 2002 May 15;73(9):1420–5.
257. Guo Z, Zhou X, Li J, Meng Q, Cao H, Kang L, et al. Mesenchymal stem cells reprogram host macrophages to attenuate obliterative bronchiolitis in murine orthotopic tracheal transplantation. *Int Immunopharmacol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;15(4):726–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2013.03.002>
258. Zhao Y, Steidle JF, Upchurch GR, Kron IL, Lau CL. Prevention of the second stage of epithelial loss is a potential novel treatment for bronchiolitis obliterans. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013 Apr;145(4):940–7.
259. Au P, Tam J, Fukumura D, Jain RK. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood*. 2008 May;111(9):4551–8.
260. Chang YS, Ahn SY, Jeon HB, Sung DK, Kim ES, Sung SI, et al. Critical Role of Vascular Endothelial Growth Factor Secreted by Mesenchymal Stem Cells in Hyperoxic Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014 Sep;51(3):391–9.
261. Davani S. Mesenchymal Progenitor Cells Differentiate into an Endothelial Phenotype, Enhance Vascular Density, and Improve Heart Function

- in a Rat Cellular Cardiomyoplasty Model. *Circulation*. 2003;108(90101):253II – 258.
262. Zimmet JM, Hare JM. Emerging role for bone marrow derived mesenchymal stem cells in myocardial regenerative therapy. *Basic Res Cardiol*. 2005 Nov;100(6):471–81.
  263. Ortiz L a, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, et al. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(26):11002–7.
  264. Zhao F, Zhang YF, Liu YG, Zhou JJ, Li ZK, Wu CG, et al. Therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells engraftment on bleomycin-induced lung injury in rats. *Transplant Proc*. 2008 Jun;40(5):1700–5.
  265. Shen Q, Chen B, Xiao Z, Zhao L, Xu X, Wan X, et al. Paracrine factors from mesenchymal stem cells attenuate epithelial injury and lung fibrosis. *Mol Med Rep*. 2015 Apr;11(4):2831–7.
  266. Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front Immunol* 2013 Jan 4(September):201.
  267. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997 Apr 4;276(5309):71-4.
  268. MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 Apr 2;284(5411):143–7.
  269. Spagnoli A, Longobardi L, O'Rear L. Cartilage disorders: potential therapeutic use of mesenchymal stem cells. *Endocr Dev* 2005 Jan;9:17–30.
  270. Zhen G, Liu H, Gu N, Zhang H, Xu Y, Zhang Z. Mesenchymal stem cells transplantation protects against rat pulmonary emphysema. *Front Biosci* 2008 Jan;13:3415–22.
  271. Loi R, Beckett T, Goncz KK, Suratt BT, Weiss DJ. Limited restoration of cystic fibrosis lung epithelium in vivo with adult bone marrow-derived cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(2):171–9.
  272. Ortiz L a, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8407–11.
  273. Kotton DN, Ma BY, Cardoso W V, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 2001 Dec;128(24):5181–8.
  274. Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005 Aug;33(2):145–52.
  275. Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E. The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J Med Invest* 2004 Aug;51(3-4):146–53.
  276. Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V, et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 2006 Apr;24(4):1095–103.
  277. Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005 Apr 15;65(8):3035–9.

278. Serakinci N, Guldberg P, Burns JS, Abdallah B, Schrødder H, Jensen T, et al. Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene* 2004 Jun 24;23(29):5095–8.
279. Wang Y, Huso DL, Harrington J, Kellner J, Jeong DK, Turney J, et al. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy* 2005 Jan;7(6):509–19.
280. Liu L, He H, Liu A, Xu J, Han J, Chen Q, et al. Therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in models of pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. *Cell Transplant* 2015 Feb 18.
281. Harting MT, Jimenez F, Xue H, Fischer UM, Baumgartner J, Dash PK, Cox CS. Intravenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic brain injury. *J Neurosurg*. 2009 Jun;110(6):1189-97.
282. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 2003 Aug 19;108(7):863–8.
283. Bonilla C, Zurita M, Aguayo C, Rodríguez A, Vaquero J. Is the subarachnoid administration of mesenchymal stromal cells a useful strategy to treat chronic brain damage? *J Cytotherapy* 2014;16(11):1501–10.
284. Mahmood A, Lu D, Qu C, Goussev A, Chopp M. Long-term recovery after bone marrow stromal cell treatment of traumatic brain injury in rats. *J Neurosurg*. 2006 Mar;104(2):272–7.
285. Yavagal DR, Lin B, Raval AP, Garza PS, Dong C, Zhao W, Rangel EB, McNiece I, Rundek T, Sacco RL, Perez-Pinzon M, Hare JM. Efficacy and dose-dependent safety of intra-arterial delivery of mesenchymal stem cells in a rodent stroke model. *PLoS One*. 2014 May 7;9(5):e93735.
286. Zimmermann O. Mesenchymal stem cells and cardiac regeneration: a sophisticated approach depends on trophic effects--what's left over? Focus on "Activation of Toll-like receptor 3 amplifies mesenchymal stem cell trophic factors and enhances therapeutic potency". *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012 Nov 15;303(10):C1004-5.

## *PUBLICACIONES DERIVADAS*



## 9 PUBLICACIONES DERIVADAS

- Parte de este trabajo ha sido motivo de una presentación en el **45 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía de Torácica (SEPAR) en el año 2012 (Madrid): Modelo animal de bronquiolitis obliterante (BOS): trasplante traqueal heterotópico.**
- A su vez, el modelo está publicado y se encuentra en PubMed con esta referencia: Gómez-de-Antonio D, Campo-Cañaveral de la Cruz JL, Gonzalez-Lois C, Santos M, Millán I, Varela de Ugarte A. **Heterotopic tracheal transplantation animal model of bronchiolitis obliterans: a reproducible model.** *Ann Transplant.* 2013 Dec 6;18:661-70. (Ver portada del documento a continuación).